

Université de Montréal

**Caractérisation de l'interaction de l'auto-antigène ADN
topoisomérase I avec les fibroblastes
dans la sclérose systémique**

par

Julie Arcand

Sciences biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Docteur
en Sciences biomédicales

Juin, 2011

© Julie Arcand, 2011

Université de Montréal
Faculté de médecine

Cette thèse intitulée:

**Caractérisation de l'interaction de l'auto-antigène ADN topoisomérase I
avec les fibroblastes dans la sclérose systémique**

présentée par :
Julie Arcand

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Isabelle Royal, président-rapporteur
Yves Raymond, directeur de recherche
Jean-Luc Senécal, co-directeur
Martin Guimond, membre du jury
Lucie Germain, examinateur externe
Marc Drolet, représentant du doyen

Résumé

La sclérose systémique (ScS) est une maladie auto-immune d'origine inconnue qui est caractérisée par des atteintes vasculaires, des dérèglements cellulaires et immunitaires. La majorité des patients atteints de ScS possède des auto-anticorps dirigés contre des protéines nucléaires. Ces auto-anticorps sont associés à des manifestations cliniques spécifiques favorisant la classification et le diagnostic de la ScS. Les anti-ADN topoisomérase I (anti-topo) sont l'un des principaux auto-anticorps retrouvés dans la ScS. Ils sont associés à la forme la plus grave de la maladie, soit la forme diffuse. Celle-ci se caractérise par une importante fibrose progressant vers une atteinte viscérale. La fibrose résulte d'une production excessive et dérégulée de matrice extracellulaire par les fibroblastes.

Bien que les anti-topo soient associés à un très mauvais pronostic et qu'ils corrélaient avec l'activité et la sévérité de la maladie, leur rôle dans la pathogenèse de la ScS n'est pas élucidé. Toutefois, depuis que certains auto-antigènes ont démontré des fonctions additionnelles lorsque retrouvés dans le milieu extracellulaire, leur contribution suscite un intérêt marqué. En effet, ces auto-antigènes, dits bifonctionnels, influencent la physiologie de certaines cellules en se liant à leur surface. Ainsi, la détermination du rôle de ces auto-antigènes ouvre la voie pour l'exploration du rôle potentiellement pathogène de leurs auto-anticorps.

Tout d'abord, nous avons démontré que l'auto-antigène topo, ciblée par les anti-topo, pouvait influencer la physiologie du fibroblaste suite à l'activation de voies de signalisations intracellulaires stimulant la migration cellulaire. Nos résultats suggèrent fortement que la topo stimule le fibroblaste suite à son interaction avec le CCR7, un récepteur de chimiokine, présent à sa surface.

Nous avons également démontré que la topo utilisait les protéoglycans à chaînes d'héparanes sulfates (HSPG) à titre de corécepteurs. Il avait été démontré que la topo liée à la surface des fibroblastes entraînait le recrutement d'anti-topo, l'adhésion et l'activation monocytaire. Nous avons ici démontré que la présence d'anticorps anti-topo entraîne

l'amplification de la liaison de la topo au niveau des HSPG. De ce fait, le complexe immunitaire à la surface des fibroblastes pourrait contribuer à l'initiation d'une cascade inflammatoire propice au développement d'une fibrose, caractéristique de la ScS.

En dernier lieu, nos résultats nous ont permis de suggérer l'utilisation de l'héparine et des héparines de bas poids moléculaires comme approche thérapeutique pour la ScS puisqu'elles permettent autant de prévenir la liaison du complexe immunitaire topo/anti-topo au niveau des HSPG que de le dissocier une fois lié.

En résumé, notre étude soutient d'abord le rôle actif de l'auto-antigène dans la physiologie des fibroblastes mais également le rôle pathogène des anti-topo en présence de la topo dans la ScS. Finalement, les résultats de notre étude permettent de proposer une approche thérapeutique potentielle pour inhiber le développement d'une cascade inflammatoire et pro-fibrotique.

Mots-clés : Sclérose systémique, auto-antigène bifonctionnel, auto-anticorps, fibroblaste, fibrose, anti-ADN topoisomérase I, ADN topoisomérase I, CCR7, héparane sulfate, héparine.

Abstract

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease of unknown etiology characterized by vascular damage, cellular and immunological disorders. The vast majority of patient sera are characterized by the presence of autoantibodies directed against nuclear proteins. The autoantibodies are associated with specific clinical manifestations and thus useful for diagnostic and classification of the disease. One of the major autoantibody groups are the anti-DNA topoisomerase I (anti-topo). They are associated with the diffuse form of the disease which is characterized by extensive cutaneous and visceral fibrosis. Increased extracellular matrix synthesis and deposition by fibroblast result in the development of fibrosis.

Although anti-topo are associated with the worst form of the disease, correlated with the activity and the severity of SSc, their exact role in the pathogenesis of SSc is controversial and still unravelled. On the other hand, there is now strong evidence for active contribution of autoantigens, targeted by autoantibodies, in autoimmune diseases. Indeed, numerous cells have been shown to be influenced by the interaction of autoantigens with their cognate receptors present on their surface. These autoantigens display cytokine-like effects toward their target cell and are called bifunctional autoantigen. Hence, determination of the exact role of these autoantigens and characterization of their interaction with their target cell may open up research perspectives for the elucidation of the potential pathogenic role of their autoantibodies.

In our study, we demonstrated that topo activates intracellular signaling pathways leading to the stimulation of fibroblast migration. We undertook experiments to characterize the interaction of the autoantigen topo with fibroblasts responsible of these cellular effects. Our results strongly suggest a direct interaction of topo with CCR7, a chemokine receptor, present on the surface of fibroblasts.

Heparan sulfate proteoglycans (HSPG), abundantly present on fibroblast surfaces, were found to act as coreceptors for topo binding. Previous work has demonstrated that

once bound to fibroblast surfaces, topo recruits anti-topo autoantibodies, which subsequently lead to adhesion and activation of monocytes. Here, we demonstrated that anti-topo autoantibodies from SSc sera lead to the amplification of topo binding to HSPG on fibroblast surfaces. The binding of topo/anti-topo IC could mediate the initiation and maintenance of an inflammatory cascade and further fibrosis development.

Hence, perturbing the binding of topo/anti-topo immune complexes to HSPG became an interesting therapeutic approach. Heparin and low molecular weight heparins were found to prevent the binding of topo and topo/anti-topo immune complexes to the fibroblast surfaces. Moreover, topo/anti-topo immune complexes could be dissociated from fibroblast surfaces by these molecules. Hence, the prevention of topo/anti-topo immune complexes binding to HS chains could result in the absence of the inflammatory cascade initiation.

Overall, our results support an active role for topo as a bifunctional autoantigen toward fibroblasts and a pathogenic role for anti-topo autoantibodies in SSc. Finally, a potential therapeutic approach is proposed which could target inflammatory and fibrotic development characteristic of SSc.

Keywords : Systemic sclerosis, bifunctional autoantigen, autoantibody, fibroblast, fibrosis, anti-DNA topoisomerase I, DNA topoisomerase I, CCR7, heparan sulfate, heparin.

Table des matières

Introduction	3
1. Le système immunitaire	3
1.1. Les maladies auto-immunes	5
2. La sclérose systémique	8
2.1. Manifestations cliniques et formes de la maladie	8
2.2. Épidémiologie et démographie	11
2.3. Génétique	12
2.4. Facteurs environnementaux	13
2.5. Modèles expérimentaux/animaux	13
3. La pathophysiologie de la sclérose systémique	15
3.1. Cellules endothéliales	16
3.2. Cellules mononucléées	18
3.3. Les fibroblastes	19
3.4. Cellules musculaires lisses vasculaires	22
4. Les auto-anticorps dans la sclérose systémique	25
4.1. Les auto-anticorps spécifiques à la sclérose systémique	27
4.1.1. Les anticorps anti-ADN topoisomérase I (AAT)	27
4.1.2. Les anticorps anti-centromère (AAC)	29
4.1.3. Les anti-ARN-polymérase III (anti-ARNPIII)	30
4.1.4. Les anti-Th/To	31
4.2. Les auto-anticorps non-spécifiques à la sclérose systémique	31
4.2.1. Les anti-PM-Scl	31
4.2.2. Les anti-U3RNP ou anti-fibrillarine	32
4.2.3. Les anti-U1RNP, anti-B23 et anti-hUBF (NOR-90)	33
4.3. Autres auto-anticorps retrouvés dans la sclérose systémique	34
4.4. Rôles des auto-anticorps	36

4.5. Origine des auto-anticorps	38
5. Les auto-antigènes.....	39
5.1. Propriétés structurales et biochimiques	41
5.2. Altérations au cours de l'apoptose	42
5.3. Propriétés immunologiques et inflammatoires.....	42
6. La mort cellulaire et l'auto-immunité	43
7. Les auto-antigènes bifonctionnels.....	45
8. Les récepteurs des chimiokines.....	47
9. Les protéoglycans.....	48
9.1. Les protéoglycans à chaînes d'héparanes sulfates	49
9.2. L'héparine	51
Résultats	53
Article no. 1 : L'auto-antigène ADN topoisomérase I interagit avec le récepteur de chimiokine 7 (CCR7) et influence la physiologie du fibroblaste dermique.....	54
Présentation de l'article no. 1	55
Contribution des auteurs à l'article no.1 :	56
Article no. 2 : Les auto-anticorps anti-ADN topoisomérase I (topo) amplifient la liaison de la topo au niveau des chaînes d'héparanes sulfates à la surface des fibroblastes dermiques.	84
Présentation de l'article no. 2.....	85
Contribution des auteurs à l'article no. 2 :	86
Discussion générale	116
Rôle de l'auto-antigène topo dans la sclérose systémique	117
Caractérisation de l'interaction de l'auto-antigène topo avec les fibroblastes.....	118
Rôle du complexe immunitaire topo/anti-topo dans la ScS	123
Cibler la liaison du complexe immunitaire topo/anti-topo comme approche thérapeutique	126
Vérification du rôle de la topo et du complexe topo/anti-topo dans des modèles physiologiques	129

Évaluation de l'héparine à titre d'agent thérapeutique dans la sclérose systémique .	131
Conclusion et perspectives.....	132
Bibliographie	134

Liste des tableaux

Tableau I.	Caractéristiques des modèles animaux pour l'étude de la sclérose systémique	15
Tableau II.	Auto-anticorps nucléaires retrouvés dans la sclérose systémique	26
Tableau III.	Mécanismes à l'origine des auto-anticorps dans la sclérose systémique	38
Tableau IV.	Facteurs influençant la sélection des auto-antigènes	41

Liste des figures

Figure 1.	Manifestations cliniques associées à la sclérose systémique.....	9
Figure 2.	Modèle pathophysiologique de la sclérose systémique.	24
Figure 3.	Patrons d'immunofluorescence indirecte sur cellules HEp-2 des auto-anticorps nucléaires spécifiques retrouvés dans la sclérose systémique..	25
Figure 4.	Hypothèse du rôle physiologique de l'auto-antigène ADN topoisomérase I chez le fibroblaste.....	122
Figure 5.	Modèle proposé pour l'effet pathogène des anti-topo dans la sclérose systémique.	125
Figure 6.	Effet de l'héparine non-fractionnée et des héparines de bas poids moléculaires dans la pathophysiologie de la sclérose systémique.....	128

Liste des Abréviations

AAN :	anticorps anti-nucléaire
AAT :	anticorps anti-ADN topoisomérase I
AAC :	anticorps anti-centromère
AACE :	anticorps anti-cellule endothéliale
AAF :	anticorps anti-fibroblaste
ADCC :	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
ADN :	acide désoxyribonucléique
AIRE :	<i>autoimmune regulator</i>
ALPS :	<i>autoimmune lymphoproliferative syndrome</i>
APS1 :	<i>autoimmune polyendocrine syndrome 1</i>
ARA :	<i>American Rheumatism Association</i>
ARNPI :	ARN polymérase I
ARNPII :	ARN polymérase II
ARNPIII :	ARN polymérase III
AT :	anti-thrombine
BAFF :	<i>B-cell activating factor</i>
CCR :	récepteur de chimiokine (motifs C-C)
CENP :	protéine centromérique
CENP-B :	protéine centromérique B
CD :	cellule dendritique

CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CMLV :	cellule musculaire lisse vasculaire
CPA :	cellule présentatrice d'antigène
CTGF :	<i>connective tissue growth factor</i>
CTLA4 :	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DID :	diabète insulino-dépendant
ELISA :	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ERK1/2 :	<i>extracellular signal-regulated kinase 1 and 2</i>
E-Sel :	E-Sélectine
FGF :	<i>fibroblast growth factor</i>
Foxp3 :	<i>forkhead box protein P3</i>
GAG:	glycosaminoglycan
GDP:	guanosine diphosphate
GTP:	guanosine triphosphate
GVHD :	<i>graft-versus-host disease</i>
HBPM:	héparine de bas poids moléculaire
HEp-2 :	<i>Human epithelioma larynx type 2</i>
HLA :	<i>Human leucocyte antigen</i>
HMGB1 :	<i>high mobility group box-1</i>
HNF :	héparine non-fractionnée
HTAP :	hypertension artérielle pulmonaire
HS:	héparane sulfate
HSPG:	protéoglycan à chaîne d'héparane sulfate

HuBF :	<i>human upstream binding factor</i>
ICAM :	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFI :	immunofluorescence indirecte
IFN- γ :	interféron- γ
IgA :	immunoglobuline de type A
IgG :	immunoglobuline de type G
IgM :	immunoglobuline de type M
IL :	interleukine
IPEX :	<i>Immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked</i>
LB :	lymphocyte B
LED :	lupus érythémateux disséminé
LT :	lymphocyte T
LT _{reg} :	lymphocyte T régulateur
MAPK :	<i>mitogen-activated-protein kinase</i>
MCTD :	<i>mixed connective-tissue disease</i>
MEC :	matrice extracellulaire
MMP :	<i>matrix metalloproteinase</i>
NHDF :	<i>normal human dermal fibroblast</i>
NO :	<i>nitric oxide</i>
NOR90 :	<i>nucleolus-organizing region 90</i>
PI3K :	phosphoinositide 3-kinase
PDGF :	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR :	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>

PG :	protéoglycan
PLC :	phospholipase C
PM-Scl :	polymyosite-sclérodémie
PR :	polyarthrite rhumatoïde
PTPN22 :	<i>protein tyrosine phosphatase non-receptor 22</i>
RAGE :	<i>receptor for advanced glycation end products</i>
RCPG :	récepteurs couplés aux protéines G
RNAPIII :	ARN polymérase III
ScS :	sclérose systémique
SPARC :	<i>secreted protein, acidic and rich in cysteine</i> (ostéonectine)
TIMP :	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
Topo :	ADN topoisomérase I
TGF- β :	<i>transforming-growth-factor beta</i>
TNF- α :	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TSK :	<i>tight skin</i>
U1RNP :	ribonucléoprotéine U1
U3RNP :	ribonucléoprotéine U3
UCD :	<i>University of California at Davis</i>
UCTD:	<i>undifferentiated connective-tissue disease</i>
VCAM :	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF :	<i>vascular endothelial growth factor</i>

À mes proches mais avant tout à moi-même!

Remerciements

La fin d'un doctorat me semblait être une légende urbaine mais il faut croire que comme le reste, toute bonne chose a une fin!

Pour arriver à cette fin, il m'a d'abord fallu rencontrer des gens passionnés pour me donner l'envie et l'opportunité de me lancer dans cette grande aventure. Je tiens donc à remercier mes directeurs de recherche, soit le Dr Yves Raymond et le Dr Jean-Luc Senécal. D'abord merci au Dr Raymond pour son expérience remarquable, sa disponibilité et particulièrement pour l'intérêt, les idées et les discussions envers mon projet. Merci au Dr Senécal pour son intérêt, ses nombreux encouragements, ses conseils et sa participation à mon projet.

Un énorme remerciement aux organismes subventionnaires qui m'ont permis d'effectuer mon doctorat sans souci financier, soit Sclérodémie Québec, l'Université de Montréal et le centre hospitalier de l'Université de Montréal. Merci également à mes directeurs de recherche ainsi qu'au Dr Martial Koenig pour leur contribution financière.

Au cours de ma carrière de «doctorante en devenir», j'ai croisé plusieurs personnes qui m'ont sans aucun doute apporté un petit ou un grand coup de pouce autant au niveau professionnel que personnel. De façon générale, je remercie tous les anciens membres du LABRAI pour m'avoir accueillie si gentiment et pour m'avoir initiée à la recherche fondamentale.

Plus particulièrement, je tiens d'abord à remercier Isabelle Clément, assistante de recherche sans qui le laboratoire n'aurait pas une telle organisation et dont la patience est plus qu'une qualité! Merci pour tes conseils, ton expertise et surtout pour ta bonne humeur contagieuse. Te côtoyer pendant toutes ses années fut un vrai plaisir!

Merci à la Dre Marie-Soleil Christin-Piché pour ton amitié, les discussions autant de nature scientifique que de toutes sortes et pour tes conseils de tout genre.

Merci au Dr Martial Koenig pour les discussions, les conseils, les coups de pouce et également pour ton amitié!

Merci à Karine Beauchemin pour ton amitié et pour les discussions de toutes sortes!

Merci à la Dre Geneviève Robitaille pour les discussions, les conseils et ta participation auprès de mon projet. Ton retour au labo a certes été d'une grande aide pour la fin de mon doctorat autant au niveau professionnel que personnel.

Merci au «gars de l'informatique», André Bachand, pour la précieuse aide!

Évidemment, un merci particulier est destiné à ma famille, ma belle-famille et mes amis qui m'ont encouragée malgré les périodes creuses mais qui ont aussi manifesté de l'intérêt malgré la complexité des mots! Plus particulièrement à mes parents pour leur soutien, leurs encouragements et pour m'avoir inculquée la persévérance. Également, à mes amies Julie'S, Marie et Véro pour votre amitié sincère, vos conseils et simplement merci d'être présentes dans ma vie! Un merci particulier à mon amie et «future» Dre Julie Amyot. Merci d'avoir été celle à qui je pouvais juste partager une réussite ou un échec et cela faisait que je me sentais simplement comprise dans ma vie d'éternelle étudiante universitaire!

Évidemment, merci à Jonathan, l'Homme que j'aime! Merci pour avoir toujours cru en moi, tu m'as vu traverser toutes les étapes de mon doctorat avec ses hauts et ses bas très bas, mais toujours, tu avais les mots justes pour me reconforter mais aussi pour me confronter de façon positive et m'encourager. Maintenant voilà, malgré les détours, je suis rendue au fil d'arrivée! Merci d'être à mes côtés, tout semble tellement plus facile et ce même malgré la distance. Finalement merci d'avoir compris et respecter mon choix d'étude. À nos projets maintenant! xx

Je souhaite également remercier les membres du jury pour avoir bien voulu lire et évaluer ma thèse, vos commentaires sont grandement appréciés, merci.

Merci à tous ceux que j'aurais pu oublier, vous saurez sans doute vous reconnaître!

Avant-propos

La médecine d'aujourd'hui fait face à de nombreuses maladies dont font partie celles que l'on qualifie d'orphelines. De par leur rareté, elles ne suscitent que très peu d'intérêt et ce, malgré leur importante morbidité. D'origine inconnue, la sclérose systémique (ScS) fait partie de ces maladies. Elle affecte près de 7 000 Québécois et la mort survient fréquemment suite à son diagnostic. La ScS est caractérisée par une triade pathologique comportant une atteinte vasculaire et des dérèglements cellulaire et immunitaire (1). Ces dérèglements sont responsables d'une surproduction et d'un dépôt excessif de matrice extracellulaire (MEC) par les fibroblastes menant au développement d'une fibrose. La fibrose peut demeurer localisée ou progresser pour s'étendre aux organes. Cette complication handicape d'abord la physionomie des patients mais surtout leurs fonctions viscérales.

Au cours des dernières années, l'étude de la pathophysiologie de la ScS a amené des traitements pouvant ralentir ou stabiliser certaines de ses manifestations mais sans toutefois pouvoir la guérir complètement. La ScS demeure donc une maladie incurable. De plus, elle possède le taux de mortalité le plus élevé parmi les maladies du tissu conjonctif, i.e les connectivites (2). Il s'avère donc essentiel de poursuivre les recherches sur ses mécanismes pathophysiologiques et d'ouvrir des nouvelles pistes d'étude.

De nombreuses études se sont questionnées sur le rôle des auto-anticorps, présents dans le sérum de la majorité des patients sclérodermiques. Représentent-ils un agent causal de la maladie ou en sont-ils simplement un épiphénomène? La réponse à cette question n'est pas définitive mais plusieurs études tendent à suggérer un rôle pathologique de la part des auto-anticorps (3-7). Depuis quelques années, les cibles des auto-anticorps, les auto-antigènes, suscitent un intérêt croissant dans le domaine des maladies auto-immunes. En effet, il a été démontré que certains auto-antigènes peuvent influencer la physiologie de certaines cellules lorsqu'ils se retrouvent dans leur milieu extracellulaire : ce sont les auto-antigènes bifonctionnels (8-11). Ainsi, l'approfondissement du rôle de ces auto-antigènes devrait permettre d'évaluer l'implication de leurs auto-anticorps dans la pathogenèse de la ScS.

Les études présentées dans cette thèse portaient d'abord sur la caractérisation de l'interaction d'un auto-antigène ciblé dans la forme diffuse de la ScS, l'ADN topoisomérase I (topo), avec les fibroblastes, cellules responsables de la synthèse de la majorité de la MEC. La ScS diffuse est la forme la plus grave de la maladie puisqu'elle présente une importante atteinte cutanée et, dans certains cas, elle s'accompagne de pathologies pulmonaires associées à un taux élevé de mortalité (12). Il a été récemment démontré que la topo se liait spécifiquement à la surface des fibroblastes, ce qui entraînait le recrutement d'anti-topo et, finalement, l'adhésion et l'activation monocytaire (13). La caractérisation des partenaires responsables de l'interaction de la topo avec le fibroblaste ainsi que l'étude des effets biologiques de cette interaction devraient permettre d'évaluer l'effet pathogène potentiel des anti-topo dans la ScS.

Objectifs spécifiques de la thèse :

1. Caractériser les effets biologiques de la topo sur la physiologie du fibroblaste; déterminer si la topo possède les caractéristiques d'un auto-antigène bifonctionnel,
2. Identifier la cible membranaire responsable de l'interaction spécifique de la topo avec les fibroblastes,
3. Évaluer l'effet des auto-anticorps anti-topo sur l'interaction de la topo avec les fibroblastes,
4. Proposer une approche thérapeutique ciblant l'effet pathogène des anti-topo sur les fibroblastes.

Introduction

1. Le système immunitaire

En tant qu'individu, le système immunitaire constitue notre meilleur moyen de défense et est essentiel à la survie. Il nous protège contre des agents de diverses origines, soit pathogènes, chimiques ou encore physiques et est composé de nombreux organes et tissus répartis dans tout notre corps. La réponse à un agent pathogène peut entraîner 2 types de réactions immunitaires et elles se différencient selon la nature de l'agression, les cellules impliquées et la réponse finale. Ces 2 types de réponses sont l'immunité innée (dite naturelle) et l'immunité acquise (dite adaptative).

Tout d'abord, notre immunité de première ligne est caractérisée par l'immunité innée. Celle-ci n'est pas spécifique à un pathogène particulier. Cette protection est assurée par différentes barrières naturelles, dont les barrières anatomiques (peau, muqueuses), les barrières physiologiques (température, pH acide, médiateurs chimiques), les barrières phagocytaires assurées par certains types cellulaires et les barrières inflammatoires. Cette réponse est rapide et, lorsque nécessaire, renforcée par la l'immunité acquise.

L'immunité acquise, contrairement à l'immunité innée, induit une réponse immunitaire spécifique. Elle permet la reconnaissance et l'élimination d'un pathogène de manière sélective. Les cellules clés de cette réponse immunitaire sont les lymphocytes B (LB) et T (LT). L'immunité acquise est basée sur des molécules de reconnaissance antigéniques hautement spécifiques et diversifiées présentes à la surface des LB et LT. Une fois que le système immunitaire a reconnu et répondu à un antigène, l'immunité acquise confère à l'individu une mémoire immunologique pour réagir en cas d'expositions éventuelles au même antigène. Bien que 2 types de réponses immunitaires puissent survenir suite à l'introduction d'un agent pathogène dans l'organisme, celles-ci travaillent souvent en collaboration.

De façon normale, les réponses immunitaires sont dirigées contre des agents étrangers ce qui confère au système immunitaire la caractéristique de reconnaissance du soi et du non soi. En effet, le système immunitaire a développé divers mécanismes pour tenter d'éliminer les cellules auto-réactives, c'est-à-dire les cellules dirigées vers des molécules du soi et ainsi induire une tolérance. Le premier mécanisme est la sélection négative ou délétion clonale des lymphocytes. Celle-ci s'effectue au niveau du thymus pour l'élimination des LT hautement réactifs pour des molécules du soi et au niveau de la moelle osseuse pour les LB immatures exprimant à leur surface des immunoglobulines dirigées contre les antigènes du soi (14). Les LB auto-réactifs ayant échappé à la délétion clonale peuvent être régulés par un autre mécanisme au niveau de la moelle osseuse, soit le *receptor editing*. Ce mécanisme permet d'éviter l'élimination du LB auto-réactif grâce à un réarrangement des chaînes légères de son récepteur de façon à ce qu'il perde son affinité pour le soi (15). D'autre part, les lymphocytes nécessitent la présence d'autres cellules pour leur activation. Par exemple, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), dont les cellules dendritiques (CD). Les LT s'activent suite à un contact avec un antigène apprêté et présenté par une CPA. Ces dernières envoient un signal de co-stimulation essentiel à l'activation du LT. L'absence de ce signal induit l'anergie clonale contrairement à l'expansion clonale lorsque ce signal est présent. Le LT demeure vivant mais existe dans un état de non-réponse (16). Outre la délétion et l'inactivation des cellules auto-réactives, ces dernières peuvent être régulées en périphérie par une population de LT dites régulatrices (LT_{reg}) (17). Les LT_{reg} sont des cellules CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ et représentent environ 10% de la population des LT CD4⁺ (18). La suppression des LT auto-réactifs par les LT_{reg} s'effectue par contacts cellulaires ou encore par sécrétion ou privation de certains facteurs solubles (19). D'ailleurs, il a été démontré que la dysfonction des LT_{reg} est associée au développement de certaines maladies auto-immunes (17, 19). Finalement, le système immunitaire possède également des mécanismes pouvant simplement limiter l'accès des auto-antigènes aux cellules auto-réactives. Par exemple, par la séquestration des auto-antigènes dans des sites privilégiés ou encore par la phagocytose des cellules apoptotiques.

La tolérance envers le soi est donc une caractéristique immunitaire essentielle. Lorsque cette tolérance n'est pas maintenue, il s'ensuit le développement de réactions auto-immunes, l'*horror autotoxicus*, décrite au début du XX^e siècle par Paul Ehrlich. Toutefois, un nouveau modèle a récemment été introduit par Polly Matzinger dans l'univers immunologique, soit le modèle de danger (*danger model*). On propose que le système immunitaire réagirait davantage à certains signaux d'alarme libérés suite à des blessures tissulaires ou cellulaires comparativement à la reconnaissance d'agents étrangers et donc du non-soi (20, 21). Ce modèle pourrait, entre autres, expliquer certains concepts de l'auto-immunité (22).

1.1. Les maladies auto-immunes

Prise individuellement une maladie auto-immune est plutôt rare, mais lorsque regroupées, les maladies auto-immunes affectent environ 3% de la population américaine (23) et sont la majeure cause de morbidité chez les femmes d'âge mûr (24). À ce jour, plus d'une soixantaine de maladies auto-immunes sont répertoriées (25) et peuvent être divisées en 2 catégories, soit les maladies auto-immunes spécifiques aux organes ou encore systémiques. Au niveau des maladies spécifiques aux organes, l'auto-immunité est dirigée contre un antigène spécifique d'un organe en particulier, ce qui lui confère sa localisation. Nous pouvons penser aux thyroïdites auto-immunes, au diabète insulino-dépendant (DID), à la myasthénie et à certaines anémies. Quant aux maladies systémiques, elles sont caractérisées par une atteinte disséminée et dirigée contre plusieurs organes. La sclérose systémique (ScS), la polyarthrite rhumatoïde (PR) ainsi que le lupus érythémateux disséminé (LED) font partie de cette catégorie de maladies auto-immunes.

L'origine des maladies auto-immunes est malheureusement encore inconnue. Toutefois une contribution génétique associée à des facteurs environnementaux ou stochastiques est certes à considérer. Malgré la forte implication d'allèles associés au *human leukocyte antigen* (HLA) à titre de facteurs de risque dans le développement de maladies auto-immunes, aucun en particulier n'a été identifié comme responsable de celles-ci (26). Les gènes du HLA sont codés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

impliqué dans la présentation antigénique. Toutefois, des gènes non-reliés au HLA ont été associés au développement des maladies auto-immunes. À titre d'exemple, certains polymorphismes au niveau de gènes impliqués dans l'immunité acquise impliquant les LT, dont le *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA4) ou le *protein tyrosine phosphatase non-receptor 22* (PTPN22) sont impliqués dans le développement du DID, de la PR et du LED (26-30).

Dans la majorité des cas, l'implication génique s'avère être, parmi d'autres, un facteur prédisposant aux maladies auto-immunes. De ce fait, la composante génétique n'est en général que partiellement responsable du développement des maladies auto-immunes (31). Toutefois, il existe de rares cas où un défaut monogénique est entièrement responsable de leur développement.

- Le syndrome APS1 (*autoimmune polyendocrine syndrome 1*) où l'auto-immunité est dirigée contre des organes endocriniens est un exemple. La mutation responsable de cette maladie se situe au niveau du gène AIRE (*autoimmune regulator*) qui code pour un facteur de transcription régulant l'expression thymique d'une variété d'antigènes du soi (27). Il s'ensuit donc une sélection négative inadéquate au niveau du thymus permettant ainsi la survie de LT auto-réactifs en périphérie (31, 32).
- Le syndrome IPEX (*immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*) est associé à une mutation d'un autre facteur de transcription, soit Foxp3, qui est directement associée au développement de symptômes auto-immuns. Ce facteur de transcription permet l'expression d'une protéine nommée Scurfine ayant une implication dans l'activation des LT (33). La mutation de Foxp3 affecte d'ailleurs la fonction suppressive des cellules LT_{reg} dans lesquelles le gène est constitutivement fortement exprimé (27, 34).
- Une mutation du gène Fas est retrouvée dans le syndrome Canale-Smith, ou ALPS (*autoimmune lymphoproliferative syndrome*). Le système Fas/Fas ligand est associé à l'apoptose cellulaire. Par conséquent, ce syndrome est caractérisé

par une prolifération accrue de lymphocytes suite à un important défaut d'apoptose (35, 36).

L'observation d'éclosion familiale de maladies auto-immunes ainsi que chez les jumeaux monozygotes soutiennent également la composante génétique dans le développement des maladies auto-immunes. À titre d'exemple, le fait d'avoir un historique familial de LED ou de PR augmente la prévalence de ces maladies dans la même famille (37). De plus, le taux de concordance chez des jumeaux monozygotes pour la PR est d'environ 12 à 30% (38) et peut s'élever à plus de 40% pour le LED (26, 38).

Outre la composante génétique, les facteurs environnementaux sont également d'importants joueurs et peuvent expliquer l'hétérogénéité des maladies auto-immunes dans les différentes populations. Les facteurs environnementaux comprennent, entre autres, les agents infectieux, dont les bactéries et virus. Ceux-ci peuvent induire l'auto-immunité selon divers mécanismes dont le plus connu est le mimétisme moléculaire. Il s'agit d'une réactivité croisée entre des épitopes similaires présents chez le pathogène et l'hôte (39). Le virus Epstein-Barr est un agent infectieux commun associé au mimétisme moléculaire dans plusieurs maladies auto-immunes, tels que le LED, la PR et la ScS (40-42). D'autre part, l'exposition professionnelle à certains agents chimiques a démontré une association avec le développement de certaines maladies auto-immunes. À titre d'exemple, une exposition à la silice ou à certains solvants est associée au développement de la ScS (43-46). Certains médicaments sont également associés au développement de maladies apparentées aux maladies auto-immunes, plus particulièrement au LED. Parmi les médicaments étudiés, seulement la procainamide et l'hydralazine sont considérées comme à haut risque (47, 48). Ces médicaments étaient utilisés comme antiarythmiques et hypotenseurs. La liste s'allongera probablement avec l'arrivée de nouvelles découvertes pharmacologiques. D'ailleurs, l'utilisation d'antagonistes du *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), de certains antibiotiques, d'anti-convulsants ou d'anti-inflammatoires ont récemment été associés au développement de LED mais tous à de faibles risques (49, 50).

Bien que les recherches et surtout l'intérêt dans le domaine des maladies auto-immunes augmentent d'année en année, il demeure que leur étiologie exacte représente toujours, à ce jour, un mystère et un défi.

2. La sclérose systémique

La sclérose systémique (ScS), aussi connue sous le nom de sclérodermie se définit étymologiquement, par les termes grecs *skleros* et *derma*, comme un durcissement de la peau. En 1753, Carlo Curzio nous offre la première description de la maladie en utilisant les termes «peau dure». Pour la première fois en 1836, Giovambattista Fantonetti utilisera le terme sclérodermie suite à une observation d'un patient avec une peau d'aspect de cuir accompagnée d'une sclérodactylie (Figure 1A). Le qualificatif systémique de la sclérodermie sera introduit en 1945 par Robert H. Goetz (51). Aujourd'hui, la ScS est souvent comparée à l'image d'une maladie qui momifie.

2.1. Manifestations cliniques et formes de la maladie

La ScS est une maladie auto-immune des tissus conjonctifs (connectivites) très hétérogène. Tout comme les autres maladies auto-immunes, l'étiologie de la ScS est inconnue à ce jour. Visuellement, elle se caractérise par une peau qui devient tendue, épaissie ou indurée. L'atteinte dermique peut être localisée ou généralisée. La peau devenue tendue limite les mouvements, par exemple au niveau des doigts (sclérodactylie) (Figure 1A). L'atteinte du visage est également fréquente entraînant une gêne esthétique importante pour les patients (Figure 1B). Cette caractéristique est due à une surproduction des composantes de la matrice extracellulaire (MEC), particulièrement le collagène. Ainsi, une fibrose dermique s'installe et dans les cas les plus graves, elle progresse pour atteindre les viscères. La fibrose handicape grandement les fonctions viscérales et peut mener à la mort. Des dommages vasculaires sont également observés chez les patients sclérodermiques. En effet, on retrouve un syndrome de Raynaud dans environ 90% des patients. Celui-ci se

défini comme étant un trouble de la circulation sanguine aux niveaux des extrémités souvent suite à une exposition au froid (Figure 1C). Ce syndrome peut précéder le développement de la ScS sur une longue période de temps (52). Dans les cas d'atteintes microvasculaires sévères, une ischémie peut s'installer et entraîner des ulcérations et de la nécrose digitale (Figure 1D).

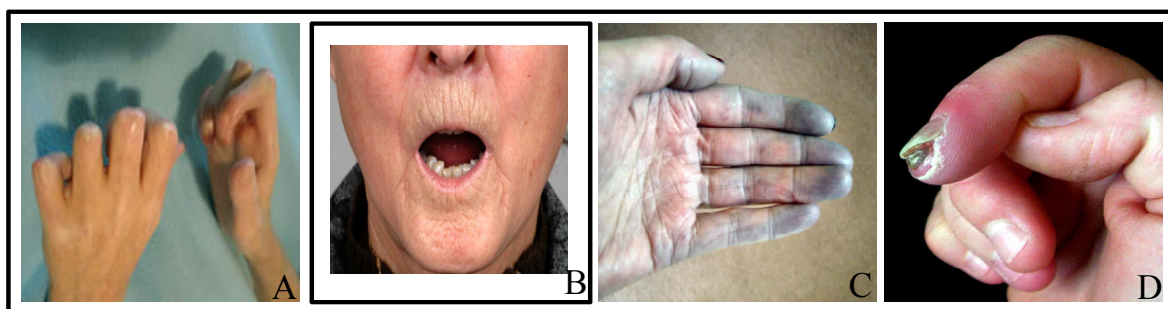


Figure 1. Manifestations cliniques associées à la sclérose systémique.

A) Sclérodactylie. B) Atteinte faciale. C) Syndrome de Raynaud. D) Ulcères digitaux. (Propriété de ISN photo repository et (53)).

La survie associée à la ScS est très variable et certains auteurs démontrent qu'elle est proportionnelle à l'atteinte dermique (54, 55). De toute évidence, avec un taux de survie moyen sur 10 ans d'environ 60% pour la forme diffuse, la sclérodermie représente la plus fatale des connectivites (2).

Les critères diagnostiques de la ScS ont évolué depuis les dernières décennies favorisant un dépistage plus précoce et permettant surtout de dépister les formes plus légères de la maladie. Ceux-ci furent d'abord proposés par l'*American Rheumatism Association* (ARA) en 1980 (56) et révisés en 1988 et 2001 par LeRoy (57, 58). Les critères utilisés en 1980 servaient majoritairement à différencier la ScS des autres connectivites mais furent qualifiés de peu sensibles pour la détection précoce de ScS ainsi que pour les formes modérées. En 1988, l'équipe de LeRoy propose de séparer la ScS en 2 formes et

depuis 2001, les critères diagnostiques de la ScS incluent l'utilisation d'avancées technologiques comme la détection des auto-anticorps nucléaires (AAN) et la capillaroscopie pour l'évaluation des désordres vasculaires. Ces critères sont majoritairement utilisés pour les études épidémiologiques.

Ainsi, la classification la plus utilisée distingue 2 formes de ScS selon le degré d'atteinte dermique et viscérale, le profil sérologique et la survie post-diagnostique (2). On retrouve donc la forme limitée et la forme diffuse.

La ScS limitée est une atteinte dermique principalement localisée aux extrémités (mains et pieds) et parfois au visage. Les patients atteints de la forme limitée présentent fréquemment un syndrome de CREST, caractérisé par de la calcinose, un syndrome de Raynaud, une dysfonction œsophagienne, une sclérodactylie et des télangiectasies. D'ailleurs, le syndrome de Raynaud est souvent une première manifestation clinique présente plusieurs années avant le développement de la ScS limitée. L'atteinte viscérale est rare, hormis pour les complications tardives d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP; 10 à 15% des cas (59)) ou de maladies pulmonaires ou intestinales interstitielles. D'ailleurs, la cause de mortalité la plus fréquente de cette forme de ScS est associée au développement de l'HTAP (60). La forme limitée de ScS est souvent accompagnée d'une sérologie présentant des auto-anticorps anti-centromère (AAC; 49 à 98% des cas) (59, 61). La présence d'AAC est fortement associée au développement de l'HTAP (62). Ainsi donc, un syndrome de Raynaud accompagné d'AAC est une valeur prédictive importante pour le développement d'une ScS limitée (63, 64). Toutefois, la forme limitée de la ScS avec AAC demeure un meilleur pronostic que tout autre ScS associée à d'autres AAN (65).

La forme diffuse est la forme la plus grave de la ScS. Une importante atteinte dermique touchant le tronc et la partie proximale des membres y est associée. Les viscères sont également souvent atteints et ce, très rapidement, soit au cours des 3 premières années de la maladie (12). En effet, des atteintes pulmonaire, rénale, cardiaque et du système digestif y sont souvent observées. L'atteinte viscérale est un très bon indicateur de la survie

du patient (12). Tout comme dans la forme limitée, le syndrome de Raynaud y est retrouvé dans la majorité des cas de ScS diffuse mais progresse rapidement pour laisser place au développement de la maladie. Les auto-anticorps anti-ADN topoisomérase I (AAT) sont associés à la forme diffuse (40%) et très fortement à une atteinte pulmonaire (66). La forme diffuse est également associée aux crises rénales surtout en présence d'anti-ARN polymérase III (anti-ARNPIII). Toutefois, les progrès thérapeutiques pour le traitement de la crise rénale font que les atteintes pulmonaires sont maintenant responsables de la majorité des décès associés à la ScS diffuse (67). Finalement, la forme diffuse présente une mortalité plus élevée et plus rapide que la forme limitée (55, 68, 69).

À cause de la forte hétérogénéité présente dans la maladie, une forme dite intermédiaire est parfois décrite par certains auteurs (55, 70). Cette forme est caractérisée par une atteinte dermique des extrémités proximales sans toutefois inclure le tronc. Elle semble majoritairement associée à la présence d'AAC et son pronostic se situe entre les 2 formes décrites ici (55).

2.2.Épidémiologie et démographie

Étant une maladie rare accompagnée de manifestations cliniques hétérogènes, la ScS représente un réel défi pour les études épidémiologiques. L'évolution des critères diagnostiques au cours des dernières années ainsi que les méthodes d'études sont également des facteurs ayant influencé ces études.

À prime abord, la ScS possède une distribution mondiale. Globalement, la ScS a une prévalence variant de 7 à 700 cas par million d'habitants (44). Plus précisément, aux États-Unis, on rapporte une prévalence de 300 cas par million d'habitants (71). Une étude récente effectuée au Québec permet d'évaluer une prévalence de ScS à 740 cas par million d'habitants (72). Ainsi, environ 7 000 Québécois seraient atteints de ScS.

Selon les études, l'ethnie fait grandement varier la prévalence de la ScS. À titre d'exemple, dans une même région, il semble que la population afro-américaine soit plus susceptible de développer la ScS que les caucasiens (73) et semble plus susceptible de

développer des formes plus graves de ScS (74). De plus, la ScS semble affecter les femmes de population noire plus tôt (44,5 ans) que chez la population caucasienne (51,5 ans) (75). Cependant, la population ethnique ayant la plus forte prévalence de ScS est située dans le sud-est des États-Unis. Il s'agit de la tribu amérindienne des Choctaws. Elle possède une prévalence estimée à 4 690 cas par million d'habitants (76) suggérant donc une susceptibilité génétique. D'autre part, la population où la ScS semble être la moins présente est la population japonaise (77). Une augmentation de l'incidence de la ScS a été observée pour plusieurs régions entre les années 1950 et 1980 (69, 78, 79) mais le dépistage précoce et l'augmentation de la survie des patients peuvent facilement influencer ces données (44). Tout comme la majorité des maladies auto-immunes, la ScS affecte davantage les femmes que les hommes avec un ratio pouvant s'élever jusqu'à 14:1 selon les régions (80). Elle affecte les femmes avec une incidence très élevée et majoritairement dans la cinquantaine. Toutefois, des formes de ScS sont répertoriées dans des populations juvéniles (81) ainsi que chez des personnes plus âgées (82, 83).

2.3.Génétique

Des études familiales sur la fréquence de ScS démontrent que la susceptibilité de développer la ScS est plus élevée lorsque des cas familiaux de ScS existent par rapport au risque présent dans la population générale (1,6% versus 0,026%) (84). Cette histoire familiale de ScS apparaît comme étant le facteur de risque le plus élevé connu à ce jour. D'autre part, une étude gémellaire a conclu davantage à une implication de facteurs environnementaux qu'à une implication génétique pour le développement de la ScS. En effet, la concordance de ScS entre des jumeaux monozygotes est faible et surtout très similaire à celle des jumeaux dizygotes (85). Malgré la faible concordance de ScS parmi les jumeaux monozygotes, des similitudes sont répertoriées au niveau moléculaire. En effet, le développement d'AAN est plus élevé chez les jumeaux monozygotes que chez les jumeaux dizygotes lorsque l'un est atteint (85). De plus, des fibroblastes dermiques avec un profil d'expression génique pro-fibrotique sont plus fréquemment retrouvés chez des jumeaux monozygotes que dizygotes (86).

Bien qu'aucun gène ne soit reconnu responsable du développement de la ScS, certains marqueurs génétiques y sont associés. C'est le cas de certains gènes du CMH. Le CMH, appelé HLA chez les humains, est une collection de gènes codant pour des protéines exprimées en surface de certaines cellules pour la présentation des antigènes. Le CMH de classe II, codé par 3 régions géniques (HLA-DP, DQ, DR), a été associé à une susceptibilité pour la ScS. Des associations entre certains allèles du CMH et la ScS existent soit pour les formes de ScS, le profil d'auto-anticorps présents (voir section 4), l'ethnie ou le sexe (87-90).

Outre l'association de certains allèles du CMH à la susceptibilité à la ScS, d'autres gènes présentant certains polymorphismes y sont associés. Parmi les plus étudiés, on retrouve les gènes codant pour le *transforming growth factor-beta* (TGF- β) (91, 92), la fibrilline-1 (93, 94) et l'ostéonectine (SPARC) (95).

2.4.Facteurs environnementaux

Puisque les facteurs génétiques n'expliquent pas tout dans le développement de la ScS, il est suggéré que certains facteurs environnementaux influencent aussi son développement. L'exposition à certains produits chimiques est associée au développement de désordres apparentés à la ScS ou à la maladie même. Parmi les produits les plus étudiés, on retrouve la silice, dont l'exposition a été grandement corrélée avec le développement de la ScS (45, 46, 96). Une association entre une exposition à des solvants et le développement de la ScS est également présente dans la littérature (43, 96). D'autres facteurs de risque tels que l'exposition à des pesticides ou à certaines résines sont également à l'étude.

2.5.Modèles expérimentaux/animaux

La ScS est caractérisée par une interaction, toujours énigmatique, entre l'activation du système immunitaire, des désordres vasculaires et de la fibrose tissulaire. Une meilleure compréhension de ces 3 aspects clés de la ScS permettrait sans aucun doute l'élaboration de thérapies efficaces, à ce jour inexistantes. Ainsi, de meilleurs modèles expérimentaux seraient importants pour la compréhension de cette pathophysiologie très hétérogène (pour

un article de revue voir (97)). À ce jour, aucun modèle animal n'est en mesure de refléter la complexité de la maladie humaine. Toutefois, il existe tout de même des modèles où certains désordres de la maladie peuvent être étudiés. Les caractéristiques de ces différents modèles animaux sont présentées dans le tableau I. Brièvement, on y retrouve 2 modèles murins où des désordres apparentés à la ScS peuvent être induits, soit le modèle murin induit à la bléomycine (98) ainsi que le modèle murin GVHD (*graft-versus-host disease*)-sclérodermique chronique (99-101). Toutefois, ces 2 modèles ne démontrent pas d'atteintes vasculaires. D'autre part, certaines mutations géniques peuvent également entraîner le développement de désordres apparentés à la ScS. C'est le cas du gène de la fibrilline-1 dans le modèle murin TSK-1 (*tight skin 1*) (102-104). Des mutations géniques induites par un agent mutagène, soit l'éthylnitrosourée, est à l'origine du modèle murin TSK-2 qui permet d'ajouter la présence d'infiltrats cellulaires inflammatoires à ce modèle (105, 106). Toutefois, les atteintes vasculaires ne sont pas présentes dans ces 2 modèles murins. Finalement, le modèle animal permettant d'avoir toutes les caractéristiques de la ScS demeure le modèle aviaire UCD-200/206. Celui-ci développe spontanément une ScS apparentée à celle retrouvée chez l'humain. En effet, l'analyse histologique montre une importante infiltration cutanée et sous-cutanée de cellules mononucléées, une occlusion vasculaire, une apoptose précoce des cellules endothéliales ainsi qu'une production accrue de MEC par les fibroblastes (107, 108). La présence d'auto-anticorps est également une caractéristique de ce modèle mais sans toutefois être spécifique pour les manifestations cliniques observées (109). Ainsi, les modèles animaux disponibles ne permettent pas l'étude impliquant tous les aspects de la maladie tels que retrouvés chez l'homme.

Tableau I. Caractéristiques des modèles animaux pour l'étude de la sclérose systémique

Modèles	Vasculopathie	Inflammation	Auto-immunité	Fibrose
Induit à la bléomycine	-	+	+	+
GVHD	-	+	+	+
TSK1	-	-	+	+
TSK2	-	+	+	+
UCD200/206	+	+	+	+

Tableau adapté selon Beyer (97).

3. La pathophysiologie de la sclérose systémique

La ScS est une maladie complexe et très hétérogène. Elle est caractérisée par une triade pathologique, soit des atteintes vasculaires artérielles et microvasculaires, des infiltrats cellulaires avec production d'auto-anticorps et la synthèse accrue de MEC pouvant mener à la fibrose cutanée et viscérale (1). Au moins 3 types cellulaires sont respectivement impliqués dans ces dérèglements : les cellules endothéliales, les cellules mononucléées (lymphocytes et monocytes) et les fibroblastes. À ce jour, nous pouvons également ajouter les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) pour leur participation potentielle dans les atteintes vasculaires, particulièrement au niveau de l'HTAP.

3.1. Cellules endothéliales

La paroi des vaisseaux sanguins artériels est formée de 3 couches qui entourent un espace rempli de sang (la lumière vasculaire). Ces 3 couches, de l'intérieur vers l'extérieur, sont l'intima, la média et l'adventice. L'intima est constituée de l'endothélium vasculaire qui à son tour est formé d'une couche de cellules endothéliales qui tapisse les vaisseaux sanguins. Les cellules endothéliales sont donc sans cesse en contact avec la circulation sanguine. La fonction de l'endothélium réside d'abord dans les échanges de nutriments entre le sang et les tissus environnants mais également dans la coagulation sanguine, la vasomotricité et la migration transendothéliale des cellules immunitaires. Ces fonctions sont maintenues grâce à plusieurs médiateurs tels que des vasoconstricteurs, des vasodilatateurs et des molécules d'adhésion cellulaire.

Les dommages vasculaires sont des manifestations cliniques observées dès le début de la ScS (108). Ils sont caractérisés par un dérèglement du tonus vasculaire, une désorganisation de l'architecture vasculaire, un durcissement intimal et éventuellement une occlusion vasculaire (110). D'ailleurs, les cellules endothéliales présentes dans les lésions cutanées sclérodermiques perdent leur intégrité jusqu'à devenir complètement détruites. Le syndrome de Raynaud, les télangiectasies multiples et l'HTAP sont des exemples de manifestations cliniques directement reliées aux atteintes vasculaires de la ScS.

Les effets des dommages vasculaires dans la ScS entraînent la production de certains médiateurs qui deviennent des marqueurs d'atteintes vasculaires artérielles et microvasculaires (111). Parmi ces marqueurs, on retrouve le facteur de Von Willebrand (112), l'endothéline-1 (113, 114), la thrombomoduline (115) et des molécules d'adhésion cellulaire (VCAM, ICAM, E-sel) (116). Ces marqueurs servent à l'initiation de l'hémostase ainsi qu'au recrutement cellulaire au site de la blessure. La dégénérescence endothéliale peut être causée par la présence d'anticorps anti-cellules endothéliales (AACE) ou par des protéases. Concernant les AACE, l'atteinte endothéliale est reliée à l'apoptose directe (voir la section 4.4) ou à un mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*; ADCC) (117, 118). À titre de protéase

responsable des atteintes vasculaires dans la ScS, la granzyme A, sécrétée par les LT cytotoxiques, peut être responsable de l'atteinte endothéliale. Elle a été retrouvée dans les lésions cutanées de patients sclérodermiques pouvant induire la lyse des cellules endothéliales *in vitro* (119).

L'angiogénèse et la vasculogénèse sont des processus physiologiques déficients chez les patients sclérodermiques. En effet, la formation de vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (angiogénèse) est diminuée malgré une forte hypoxie et une surexpression de *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et de ses récepteurs (120). La formation de nouveaux vaisseaux sanguins indépendamment des vaisseaux existants (vasculogénèse) nécessite des cellules endothéliales progénitrices dont le nombre est significativement réduit chez les patients sclérodermiques (121). Toutefois, la cause de ce nombre cellulaire réduit ne semble pas résolue (122).

Le maintien du tonus vasculaire est également un rôle important de l'endothélium et la régulation de l'équilibre vasculaire est un mécanisme défectueux dans la ScS. Les cellules endothéliales sécrètent des substances vasodilatatrices et vasoconstrictrices régulant ce tonus. Il semble que l'équilibre entre celles-ci soit altéré. En effet, l'endothéline-1, agent vasoconstricteur et stimulateur pour la production de MEC, est augmentée chez les patients sclérodermiques (123, 124). D'autre part, l'oxyde nitrique (NO) et la prostacycline, substances vasodilatatrices, sont retrouvées à la baisse chez les patients sclérodermiques (111)

Les cellules endothéliales endommagées peuvent représenter une source d'activateurs pour les autres types cellulaires impliquées dans la ScS. D'abord, l'augmentation de certaines molécules d'adhésion cellulaire permet le recrutement de cellules immunitaires et la sécrétion d'IL-6 participe à l'activation du fibroblaste (125). Récemment, un fragment du perlecan, présent dans un milieu conditionné de cellules endothéliales en apoptose, a été identifié comme un médiateur fibrogénique pour les fibroblastes (126).

3.2. Cellules mononucléées

Des infiltrats de cellules mononucléées (monocytes et lymphocytes) sont détectés tôt dans les biopsies de patients sclérodermiques, soit avant même le développement d'atteintes vasculaires et d'une fibrose cutanée et viscérale (127). Il est donc suggéré que l'inflammation joue un rôle dans l'initiation de la ScS. L'infiltration mononucléaire est également corrélée avec la sévérité et la progression de l'atteinte cutanée (128).

Les monocytes sont des cellules capables de phagocytose, de motilité vers les tissus où ils deviennent macrophages, d'activité cytotoxique, de sécrétion de cytokines inflammatoires ainsi que de présentation antigénique aux LT. Les monocytes/macrophages représentent les cellules prédominantes dans les lésions sclérodermiques au début (129) mais également tout au long de la maladie (130). De nombreux médiateurs chimiques sont sécrétés par les cellules monocytaires et participent à maintenir un état inflammatoire, tels que le TGF- β , une cytokine pro-fibrotique, et le *platelet-derived growth factor-BB* (PDGF-BB).

De nombreux lymphocytes sont également retrouvés dans les biopsies de patients sclérodermiques. Des LT auxiliaires (CD4+) et cytotoxiques (CD8+) s'y retrouvent majoritairement (128, 129). Des LT mémoires ont également été retrouvés dans des biopsies pulmonaires de patients sclérodermiques avec atteintes pulmonaires (131). Les LT chez les patients sclérodermiques démontrent des signes d'activation suggérant une stimulation antigénique (132). Par ailleurs, il a été démontré que les LT CD4+ proviennent d'une expansion clonale en réponse à un antigène dont la nature est inconnue (133). Toutefois, certains auto-antigènes, en particulier la topo, pourraient être responsables d'une expansion clonale des LT chez certains patients sclérodermiques (134). Les LT retrouvés dans les lésions sclérodermiques influencent les cellules environnantes par la sécrétion de certaines cytokines. À titre d'exemple, dans les lavages broncho-alvéolaires de patients sclérodermiques, les taux d'IL-4 sont prédominants comparativement à l'interféron- γ (IFN- γ), une cytokine anti-fibrotique (135, 136) majoritairement retrouvé chez les contrôles sains (137). L'IL-4 est une cytokine pro-fibrotique associée à la synthèse de MEC, dont le

collagène (138). Dans le même ordre d'idée, les taux plasmatiques d'IL-4 sont élevés chez les patients sclérodermiques (139, 140). Une autre cytokine sécrétée par le LT et élevée dans la circulation et les lésions cutanées des patients sclérodermiques est l'IL-17 (141). Elle stimule la prolifération des fibroblastes (141), la sécrétion d'IL-6 par les fibroblastes et les cellules endothéliales (125) ainsi que l'expression de molécules d'adhésion cellulaire à la surface des cellules endothéliales (141). L'IL-6, une autre cytokine pro-fibrotique, est également élevée dans le sérum des patients (142, 143). Les LT sécrètent également l'IL-13, cytokine pro-fibrotique via l'activation de la synthèse de TGF- β par les macrophages mais également de façon indépendante (144).

Bien que les LT soient parmi les lymphocytes majoritairement présents dans les lésions sclérodermiques, les LB ne deviennent pas négligeables pour autant. Les LB de patients sclérodermiques démontrent des signes d'hyperactivation cellulaire soit l'hypergammaglobulinémie (127), la surexpression du CD19 (145), la présence de LB mémoires (146) et la présence d'auto-anticorps dans plus de 90% des cas (67, 147). Le LB peut activer le processus fibrotique par la sécrétion de cytokines ou d'auto-anticorps. Outre le LT comme stimulateur de la sécrétion d'IL-6, le LB est en mesure d'en sécréter favorisant la production de collagène par le fibroblaste (148, 149). La sécrétion d'IL-6 pourrait être induite par la surexpression de *B-cell activating factor* (BAFF) sur les LB de patients sclérodermiques (150). En ce qui concerne les auto-anticorps, les anticorps anti-fibrilline-1 ont été associés avec l'activation d'un phénotype pro-fibrotique du fibroblaste via une voie dépendante du TGF- β (voir section 4.3 (7)). Les AACE induisent l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales contribuant au recrutement de cellules mononucléées (voir section 4.4 (116)). Finalement, les anticorps anti-fibroblastes (AAF) induisent un phénotype pro-adhésif et pro-inflammatoire des fibroblastes (voir section 4.4 (5)).

3.3. Les fibroblastes

Le fibroblaste constitue le type cellulaire prédominant du tissu conjonctif. Il est responsable de la synthèse des constituants de la MEC, dont les fibres de collagène. Les

fibroblastes participent d'abord à maintenir une architecture tissulaire mais également à la réparation de blessure. En situation normale, le fibroblaste migre vers la blessure dans le but de proliférer et de synthétiser de la MEC jusqu'à combler le manque. Au cours du processus de cicatrisation, les fibroblastes se différencient en myofibroblastes en réponse à certains médiateurs présents dans le tissu. Les myofibroblastes possèdent des fibres contractiles dans leur cytoplasme leur permettant de contracter la plaie et ainsi favoriser sa fermeture. Ils sont également en mesure de sécréter une plus grande quantité de MEC. La majorité des myofibroblastes entrent en apoptose à la fin du processus de cicatrisation pour laisser place au tissu fonctionnel.

La production excessive de MEC par les fibroblastes est une caractéristique importante de la ScS. Parmi les éléments retrouvés en excès, on compte le collagène, de type I, III, VI et VII, la fibronectine, des protéoglycans, la laminine, la tenascine et la fibrilline-1 (151). À ce jour, la cause de cette production accrue de MEC demeure incertaine. Il peut s'agir d'une régulation anormale d'un processus physiologique normal face à une blessure ou encore une dérégulation intrinsèque des gènes des protéines de la MEC (1).

La fibrogenèse n'est pas toujours pathologique dans la mesure où elle est contrôlée et elle fait donc partie d'un processus normal de réparation de blessure. Toutefois, une fibrogenèse incontrôlée résultera en une dysfonction viscérale (152). Certains facteurs présents dans l'environnement cellulaire peuvent affecter le comportement des fibroblastes et les maintenir dans un état activé. Tel que mentionné précédemment, les cellules endothéliales et mononucléées sécrètent des substances pro-fibrotiques pouvant affecter la physiologie du fibroblaste. Parmi celles-ci, on retrouve le TGF- β , l'IL-4 et l'IL-6. Ces cytokines stimulent la production de collagène par le fibroblaste, mais stimulent également le recrutement d'autres fibroblastes. Une fois activé à produire la MEC, le fibroblaste sécrète à son tour des cytokines pouvant agir de façon autocrine et participer à sa propre activation. Ainsi, l'IL-6, l'IL-8, le TGF- β , le *connective tissue growth factor* (CTGF) et le PDGF sont sécrétés par le fibroblaste activé (110).

Le TGF- β est une cytokine importante dans la ScS puisqu'elle est impliquée dans l'initiation de la fibrose. Tout d'abord, le TGF- β stimule la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste, cellule spécialisée en production de collagène (153). Les myofibroblastes sont très présents au niveau des lésions sclérodermiques. Le TGF- β induit également la production de CTGF par le fibroblaste. Cette cytokine est constitutivement exprimée dans la ScS (154-156) et est impliquée dans le maintien des lésions fibrotiques (157). Son expression semble également corrélée avec l'atteinte sclérotique (154). Somme toute, les infiltrats cellulaires influencent grandement la sécrétion de protéines de la MEC par les fibroblastes.

De façon plus intrinsèque au fibroblaste, une altération dans la régulation génique des protéines de la MEC peut être liée à la surproduction de ces protéines. Dans la ScS, la régulation du collagène de type I est particulièrement impliquée. En collaboration avec la voie de signalisation du TGF- β , plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans sa production et régulation. Parmi les plus étudiés, on retrouve les Smad, le Sp1/3, le Myb, le Fli1 et le p300/CBP (152). Au niveau du fibroblaste sclérodermique, on retrouve des taux élevés de Smad 2 et 3 (158), protéines effectrices cytoplasmiques pour la synthèse de collagène suite à une stimulation par le TGF- β (159). D'ailleurs, il a été démontré qu'une déficience en Smad 3 atténuait la fibrose chez le modèle murin de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine (160). De plus, l'expression de Smad 7, une protéine régulatrice négative de cette voie de production de collagène, est à la baisse chez les fibroblastes sclérodermiques (161). Une autre protéine impliquée positivement dans la régulation génique du collagène de type I est le Sp1. Ce facteur de transcription active le promoteur COL1A2 chez les fibroblastes normaux (162). Par ailleurs, sa phosphorylation est augmentée chez les fibroblastes sclérodermiques (163). Fli1, un régulateur négatif de l'activation du promoteur COL1A2 (162), est régulé à la baisse chez des fibroblastes sclérodermiques en culture (152). Chez des fibroblastes normaux, la famille de facteurs de transcription Myb est impliquée dans la régulation positive du promoteur de COL1A1 et COL1A2. Un de ces facteurs de transcription, c-Myb, est surexprimé chez des fibroblastes sclérodermiques (164-166). Finalement, les protéines co-activatrices p300/CBP

interagissent avec les facteurs de transcription Smad et Sp1 et régulent le promoteur COL1A2. Chez les fibroblastes sclérodermiques, on retrouve des taux plus élevés de p300 (167) ou encore une interaction plus importante de p300 avec Smad ou Sp1 (168). Il semble donc qu'une régulation génique en faveur d'une surproduction de MEC soit retrouvée chez les fibroblastes sclérodermiques.

Outre la régulation génique altérée pour la synthèse du collagène, les fibroblastes sclérodermiques démontrent une dysfonction au niveau de sa dégradation. L'équilibre entre les métalloprotéinases de la matrice (MMP; *matrix metalloproteinase*) et les inhibiteurs de MMP (TIMP; *tissue inhibitor of metalloproteinase*) est important pour éviter le développement d'une fibrogenèse non contrôlée. Les MMP sont des protéinases responsables de la dégradation de la MEC tandis que les TIMPS inhibent les MMP. Il a été démontré que les fibroblastes sclérodermiques surexpriment TIMP-1 (169, 170) et sont déficients en MMP-1 favorisant une accumulation de MEC (169, 171).

Les fibroblastes sclérodermiques démontrent également un taux de résistance remarquable face aux mécanismes voulant réguler leur activation. En effet, ils résistent à l'IFN- γ , une cytokine anti-fibrotique (172) mais également à l'apoptose médiée par Fas (173). Cette résistance semble être dépendante d'une exposition prolongée au TGF- β . Sachant que cette cytokine entraîne la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste, très présent dans les lésions sclérodermiques, une résistance à l'apoptose de ces cellules maintient, encore ici, l'effet fibrotique observée dans la ScS (173).

3.4. Cellules musculaires lisses vasculaires

Les CMLV représentent un autre type cellulaire impliqué dans la pathogenèse de la ScS. Leur rôle est moins bien caractérisé mais sans toutefois être négligeable puisqu'elles pourraient jouer un rôle important au niveau du développement de l'HTAP (4, 9). On retrouve les CMLV majoritairement au niveau de la média des vaisseaux sanguins. À cause de leur pouvoir de contraction, elles participent à la vasomotricité et donc régulent le débit sanguin et maintiennent une pression artérielle constante. Elles sont également recrutées

lors du remodelage vasculaire et migrent donc vers l'intima pour proliférer et sécréter des facteurs essentiels à la réparation de blessure. Dans le but d'accomplir ces fonctions, les CMLV vont modifier leur phénotype de façon transitoire et réversible, soit d'un phénotype contractile à synthétique (174). Le phénotype contractile représente les cellules dans un état quiescent contrairement à l'état actif représenté par le phénotype synthétique. Lorsque le remodelage est complété de façon normale, les CMLV reprennent leur phénotype contractile. Toutefois, dans certaines pathologies, les CMLV synthétiques perdurent et peuvent entraîner une occlusion des vaisseaux sanguins suite à une migration, une prolifération et une sécrétion de protéines de la MEC accrues. Cette anomalie pourrait ainsi être reliée à une oblitération des vaisseaux tel qu'observée lors de l'HTAP retrouvée dans la ScS (175).

Pour conclure, la pathogenèse de la ScS implique différents types cellulaires intimement reliés par la sécrétion de cytokines ou de facteurs de croissance. Aujourd'hui, il est possible d'établir un modèle de pathogenèse reliant la triade pathologique de la ScS (Figure 2). Tout d'abord, il est suggéré que l'atteinte vasculaire soit un élément précoce dans le développement de la maladie. Ce dommage permet l'infiltration de cellules mononucléées, composée majoritairement de monocytes/macrophages et de lymphocytes, dans les tissus. Ce recrutement cellulaire entraîne l'initiation d'un processus inflammatoire devenant chronique par l'activation de LB auto-réactifs et par une expansion clonale de LT. Les médiateurs chimiques sécrétés permettent le recrutement et l'activation de CMLV et de fibroblastes. Ceux-ci sécrètent de façon incontrôlée des composantes de la MEC et perpétuent un cycle pro-fibrotique menant au développement d'atteintes vasculaires et de la fibrose observée dans la ScS.

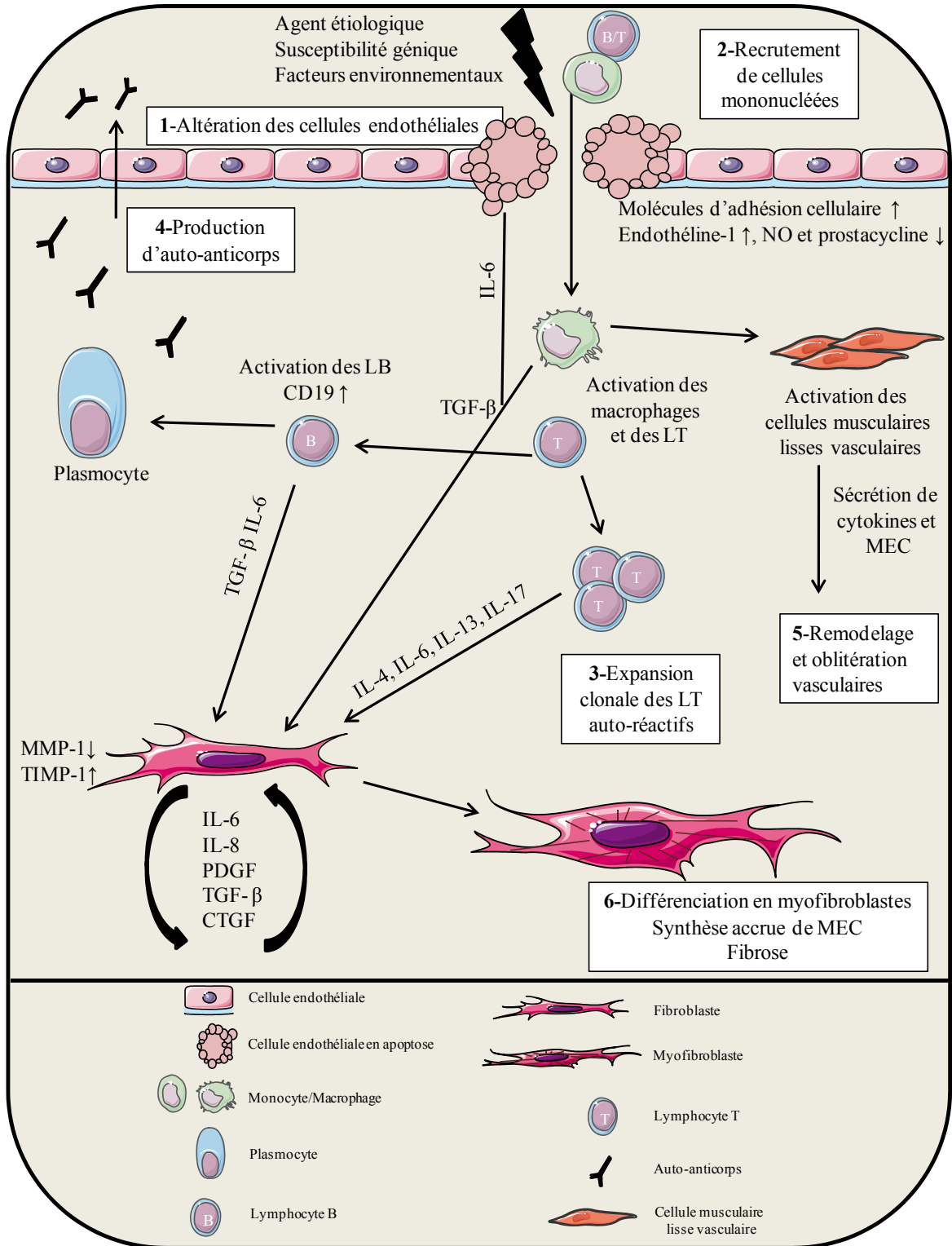


Figure 2. Modèle pathophysiologique de la sclérose systémique.

4. Les auto-anticorps dans la sclérose systémique

L'activation du système immunitaire dans la ScS peut s'observer, entre autres, par la détection d'auto-anticorps. En effet, la sérologie des patients atteints de ScS démontre la présence d'auto-anticorps nucléaires (AAN) dans plus de 90% des cas (67, 147). Ils furent détectés pour la première fois dans les années 1960 (176). Ces AAN sont présents avant l'apparition de symptômes et sont très utiles pour le diagnostic de la maladie puisqu'ils sont très spécifiques et associés à certains phénotypes de la ScS ainsi qu'à son évolution. La technique de détection utilisée est l'immunofluorescence indirecte (IFI) sur des cellules HEp-2 (*human epithelioma larynx type 2*) à titre de substrat. Cette technique permet de visualiser différents patrons d'immunofluorescence selon l'AAN (Figure 2). Des techniques de détection supplémentaires sont parfois nécessaires dépendamment de l'AAN recherché (177).

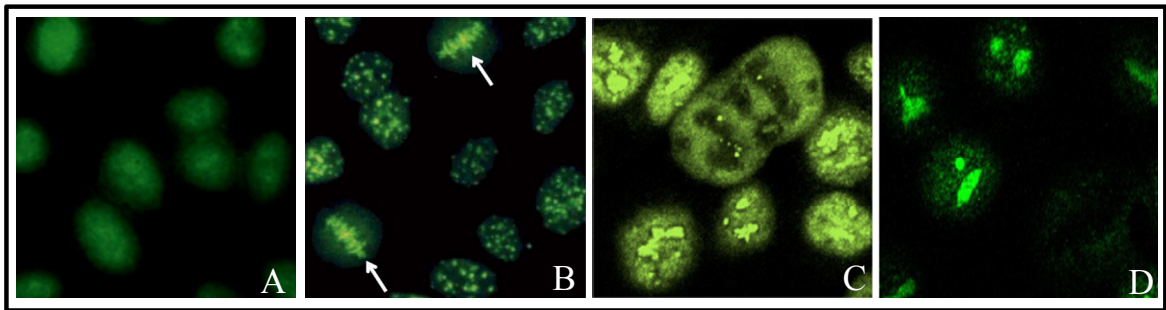


Figure 3. Patrons d'immunofluorescence indirecte sur cellules HEp-2 des auto-anticorps nucléaires spécifiques retrouvés dans la sclérose systémique.

A) Les anti-ADN topoisomérase I démontrent une fluorescence homogène et nucléolaire, caractérisée de «verre dépoli». B) Les anti-centromère illustrent une fluorescence en petits points correspondant aux chromosomes qui s'alignent, dans certains cas (flèches), au niveau de la plaque équatoriale lors d'une mitose. C) Les anti-ARN polymérase III démontrent une fluorescence nucléolaire, dans certains cas avec halo. D) Les anti-Th/To

démontrent une fluorescence typiquement nucléolaire. (Figure adaptée de Hachulla et al (178) et Koenig et al (179)).

Tableau II. Auto-anticorps nucléaires retrouvés dans la sclérose systémique		
Auto-anticorps spécifiques	Manifestations cliniques	Fréquence moyenne (%)[*]
Anti-ADN topoisomérase I (AAT)	ScS diffuse avec fibrose pulmonaire	30
Anti-centromère (AAC) (anti-CENP-B)	ScS limitée avec HTAP, syndrome de CREST	30
Anti-ARN polymérase III (anti-ARNPIII)	ScS diffuse avec crises rénales	15
Anti-Th/To	ScS limitée avec atteinte pulmonaire et rénale	5
Auto-anticorps non-spécifiques	Manifestations cliniques	Fréquence moyenne (%)[*]
Anti-PM-Scl	ScS limitée et myosite	< 5
Anti-U3RNP (anti-fibrillarine)	ScS diffuse avec HTAP	5
Anti-U1RNP	ScS limitée et diffuse, autres connectivites	5

ScS : sclérose systémique, HTAP : hypertension artérielle pulmonaire.

^{*} : adapté selon Koenig et al (179).

4.1. Les auto-anticorps spécifiques à la sclérose systémique

On retrouve 4 AAN spécifiques à la ScS, c'est-à-dire qu'ils sont peu ou pas retrouvés dans d'autres connectivites et sont habituellement mutuellement exclusifs. Ils possèdent donc une forte valeur prédictive pour la ScS (179). Ces AAN sont les anticorps anti-ADN topoisomérase I (AAT), les anti-centromère (AAC), les anti-ARN polymérase III (anti-ARNPIII) et les anti-Th/To. À eux seuls, ils représentent environ 75 à 80% des AAN dans la ScS (179). Ils possèdent une distribution mondiale avec des fréquences moyennes présentées dans le tableau II. Toutefois, des variations ethniques et génétiques influencent ces données et il s'avère donc important que chaque centre d'étude établisse ses propres fréquences d'auto-anticorps.

4.1.1. Les anticorps anti-ADN topoisomérase I (AAT)

Les AAT ont d'abord été décrits comme des anticorps dirigés contre une protéine de 70 kDa (Scl-70) associée à la chromatine (180). Cette protéine fut ensuite identifiée comme étant l'ADN topoisomérase I (topo) (181). La topo est une enzyme nucléaire de 100 kDa dont la fonction est de relaxer la structure hélicoïdale de l'ADN lors de la transcription et la duplication (182). La topo est composée de 765 acides aminés et sa structure permet de la diviser en 4 domaines (183) : **1)** Le domaine NH₂-terminal, constitué des 200 premiers acides aminés (24 kDa), est fortement chargé et possède des signaux de localisation nucléaire (184), **2)** le domaine central (*core domain*) est constitué des acides aminés 200 à 635 (54 kDa), **3)** le domaine *linker* (acides aminés 636 à 712; 5 kDa) et **4)** le domaine COOH-terminal, soit les acides aminés 713 à 765 (8 kDa). Celui-ci possède le site catalytique de l'enzyme (Tyr⁷²³) (185). Toutefois, le domaine central et le domaine COOH-terminal sont essentiels à l'activité catalytique de l'enzyme (183). Quant au domaine NH₂-terminal, il est très sensible à la protéolyse. En effet, la topo se dégrade en fragments de 70 kDa (fragment majeur), 80 kDa et 87 kDa tout en conservant leur activité enzymatique (181, 184, 186).

Les méthodes de détection des AAT dans le sérum des patients sclérodermiques sont majoritairement l'immunodiffusion, l'ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) et l'immunobuvardage (177). Ils peuvent être confirmés en IFI par un patron nucléaire homogène et nucléolaire (verre dépoli) sur des cellules HEp-2 (Figure 2A). La plupart des AAT retrouvés sont d'isotype IgG, quoique des IgM et IgA aient déjà été détectés (187). La recherche d'un épitope dominant des AAT a fait l'objet de nombreuses études (188-192). Ces épitopes varient selon la méthode utilisée et les groupes étudiés. Toutefois, il semble que l'épitope majeur se situe dans la région du domaine central et plus particulièrement au niveau des acides aminés 547 à 565 (190).

Les AAT sont présents chez environ 30% des patients sclérodermiques et sont très spécifiques et prédictifs de la ScS (179). On retrouve rarement des AAT chez des individus sains (177), dans les autres connectivites (177, 193, 194) ou dans des cas de parenté de premier degré présentant un cas de sclérodermie (195) hormis pour les jumeaux monozygotes (85). Ils sont associés à la sclérodermie de forme diffuse dans environ 40% des cas et dans seulement environ 10% des cas de forme limitée (66, 177). La présence d'AAT est majoritairement associée à une atteinte dermique étendue ainsi qu'au développement d'atteinte pulmonaire et ils sont donc signe d'un mauvais pronostic (55, 59, 65, 196).

Les titres des AAT semblent évoluer au cours de la maladie et sont représentatifs de la sévérité et de l'activité de celle-ci (196, 197). De plus, il a été démontré chez un certain groupe de patients que les AAT disparaissent après un certain temps et de ce fait, une amélioration de leur état fut observée.

Des études génétiques ont démontré que les gènes du CMH influençaient l'expression des AAN. Il a été démontré que les AAT sont associés avec les allèles HLA-DRB1, DQB1 et DPB1. Globalement, l'allèle DRB1*11 y est associé pour plusieurs groupes ethniques et plus précisément DRB1*1101 chez les caucasiens et les afro-américains, DRB1*1104 chez les japonais et DRB1*1502 chez les caucasiens et les hispaniques (198-201).

4.1.2. Les anticorps anti-centromère (AAC)

Les cibles des AAC sont des protéines centromériques (CENP) associées au centromère des chromosomes qui forme le kinétochore. Celui-ci permet de lier le chromosome à la plaque équatoriale lors de la division cellulaire. Les CENP sont au nombre de 6, de CENP-A à CENP-F, mais il a été démontré que les sera des patients AAC positifs reconnaissent majoritairement 3 d'entre elles, soit la CENP-A, CENP-B et CENP-C (202). Toutefois, la CENP-B est maintenant reconnue comme l'auto-antigène cible des AAC dans la ScS puisque tous les sera AAC positifs possèdent des titres élevés d'anti-CENP-B (203). La CENP-B est une protéine de 80 kDa dont la fonction n'est pas encore bien déterminée mais semble être responsable d'un équilibre dans la formation du centromère (204).

Les AAC furent d'abord détectés par des techniques d'IFI (205) présentant un patron très distinctif (punctiforme) des autres AAN puisqu'il suit l'alignement des centromères lors de la division cellulaire (Figure 2B). On peut également détecter spécifiquement les AAC par immunodiffusion et immunobuvardage (177). Les anti-CENP-B retrouvés sont majoritairement d'isotype IgG et l'épitope majeur se situe dans la région C-terminale de la protéine (206).

On retrouve les AAC dans environ 30% des cas de ScS et cela varie selon l'ethnie (179). Peu retrouvés chez des sujets sains ou dans d'autres connectivites, les AAC sont très spécifiques pour la ScS (207). Ils possèdent une valeur prédictive pour la ScS de près de 90% lorsque détectés par IFI (177, 179). Ils sont associés avec la forme limitée ainsi qu'au syndrome de CREST (55, 66). D'ailleurs, la détection d'AAC chez un patient ayant un syndrome de Raynaud suggère fortement le développement d'une ScS limitée. Les AAC sont également associés au développement d'une HTAP mais non de fibrose pulmonaire (62, 65). Lorsque non associés à un syndrome de CREST ou une ScS, les AAC démontrent de faibles titres ou encore ne sont pas spécifiques à la CENP-B (208).

Malgré le risque de développer l'HTAP, la présence d'AAC est associée à un meilleur pronostic que tout autre AAN spécifiques à la ScS et possède ainsi un taux de

mortalité plus faible (55, 65). Les titres d'AAC étudiés par ELISA démontrent une stabilité tout au long de la maladie et ne seraient pas associés à l'activité de la maladie (209, 210).

La composante génétique dans le développement d'AAC est soutenue par des associations avec HLA-DRB1*01/04 et DQB1*05 (198, 199). Également, des marqueurs non-HLA ont récemment été associés à la production d'AAC, soit la présence de polymorphismes au niveau du gène du TNF (211).

Les AAT et AAC représentent les 2 AAN majeures de la ScS. Ils sont associés à 2 formes distinctes de la ScS et sont habituellement mutuellement exclusifs. Toutefois, des cas de coexistence entre ces 2 AAN sont répertoriés (55, 212).

4.1.3. Les anti-ARN-polymérase III (anti-ARNPIII)

Un AAN est retrouvé dans environ 15% des cas de ScS, soit les anti-ARNPIII (179). Les ARN polymérase I sont également reconnus par ces sera, et dans certains cas les ARN polymérase II (213). Les anti-ARNPI et III sont spécifiques à la ScS tandis que les anti-ARNPII sont également retrouvés chez certains patients avec le LED (214).

Les anti-ARNPIII sont associés à la forme diffuse de ScS et surtout au développement de crises rénales (67, 215). Il devient donc important de déceler ces AAN. Les techniques de détection par immunobuvardage ou l'immunoprécipitation démontrent une forte spécificité (177, 216). En IFI, on peut lui associer un patron nucléolaire (Figure 2C). Depuis que des études ont identifié l'épitope reconnu par la majorité des sera positifs pour l'ARNPIII (217), un test ELISA est devenu accessible et spécifique pour le dépistage de ces auto-anticorps (213).

Les titres d'anti-ARNPIII fluctuent au cours de la maladie et semblent être reliés à l'activité de la maladie (213, 218). L'association HLA et les anti-ARNPIII est controversée et nécessite davantage d'études pour en tirer des conclusions satisfaisantes (216, 219-222). Finalement, malgré une atteinte dermique très sévère et la présence de crises rénales, cette forme de ScS diffuse est associée à un meilleur pronostic que les formes diffuses avec AAT (67, 215).

4.1.4. Les anti-Th/To

Ces AAN sont dirigés contre des composantes des complexes de ribonucléases P et MRP, plus particulièrement les Rp25 et hPop1 (223). Les anti-Th/To sont des AAN retrouvés dans environ 5% des cas de ScS et malgré qu'ils soient associés à une forme d'atteinte dermique modérée, leur association avec des atteintes viscérales est fréquente. Par le fait même, ils sont associés à un faible taux de survie. En effet, de la fibrose pulmonaire et de l'HTAP ont été démontrées dans une cohorte de patients positifs pour les anti-Th/To (67). Dans certains cas, on peut également observer des crises rénales et des troubles gastro-intestinaux (224).

L'IFI avec anti-Th/To démontre un patron nucléolaire non-spécifique pour diagnostiquer la ScS (Figure 2D). Ainsi, la détection d'anti-Th/To doit être accompagné de signes cliniques suggérant une ScS et confirmé par des techniques plus spécifiques telle que l'immunoprécipitation (179).

Les anti-Th/To sont associés à l'allèle HLA-DRB1*11 (225).

4.2. Les auto-anticorps non-spécifiques à la sclérose systémique

Outre les 4 AAN spécifiques à la ScS, d'autres auto-anticorps sont associés à des cas de ScS mais ils ne sont pas exclusifs à celle-ci. Ils se retrouvent également associés à d'autres connectivites telles que certaines myosites (226). Ces auto-anticorps comprennent les anticorps anti-PM-Scl, les anti-U3RNP (anti-fibrillarine) et les anti-U1RNP (Tableau II, page 26). Ces AAN sont exclusifs entre eux et rarement retrouvés chez des individus sains (177, 227).

4.2.1. Les anti-PM-Scl

Les anti-PM-Scl furent les premiers auto-anticorps nucléolaires à être identifiés, à l'aide de technique d'immunodiffusion, en 1977 (228). Aujourd'hui, la détection des anti-PM-Scl se fait par immunoprécipitation (229). Les anti-PM-Scl ont comme cible principale les protéines PM-Scl-100 et PM-Scl-75 de l'exosome nucléolaire humain impliqué dans la

dégradation d'espèces d'ARN. Plus récemment, 6 protéines de ce complexe ont également été reconnues comme étant la cible des anti-PM-Scl (230).

Les anti-PM-Scl sont retrouvés chez des patients atteints de myosites (6%), de ScS (2%) et majoritairement dans le syndrome de chevauchement polymyosite-ScS (50%) (62, 231). En fait, environ 80% des patients avec anti-PM-Scl développeront ce syndrome de chevauchement (232).

Les anti-PM-Scl sont associés à la forme limitée de la ScS (15%) mais de façon moins significative que les AAC. En effet, malgré la forte spécificité pour la ScS, les anti-PM-Scl sont peu sensibles pour la détection des formes de ScS limitées et n'ont ainsi pas de valeur prédictive significative pour la maladie (177).

Les anti-PM-Scl sont fortement associés aux allèles HLA-DQA1*0501 et DRB1*0301 (199).

4.2.2. Les anti-U3RNP ou anti-fibrillarine

C'est en 1988 que les anti-fibrillarine furent identifiés pour la première fois chez des patients sclérodermiques (233). Leur cible est une protéine de 34 kDa située dans la composante fibrillaire dense du nucléole, la fibrillarine, qui est associée au complexe de la U3RNP (ribonucléoprotéine) (178).

Les anti-fibrillarine sont présents chez environ 4% des patients sclérodermiques et sont exclusifs des AAT, des AAC et des anti-RNAPIII (62). Ils ont également été retrouvés chez des patients atteints de LED, de syndrome de Raynaud et de connectivites indifférenciées (UCTD; *undifferentiated connective-tissue disease*) (228). La fréquence des anti-fibrillarine est plus élevée chez les hommes afro-américains atteints de ScS (234-236). Ces auto-anticorps sont associés avec la forme diffuse de la ScS avec atteintes cardiaque, rénale et au développement d'HTAP (236). On retrouve toutefois des anti-fibrillarine dans les formes limitées de ScS (236) mais sans valeur prédictive pour l'HTAP (62). Finalement, malgré l'atteinte viscérale importante, les anti-fibrillarine ne sont pas associés à un taux élevé de mortalité (236).

Les anti-fibrillarine ont été associés à l'allèle HLA-DQB1*0604 (235) mais cette association n'a pas été confirmée par un autre groupe (220).

4.2.3. Les anti-U1RNP, anti-B23 et anti-hUBF (NOR-90)

Bien qu'ils soient peu étudiés, ces auto-anticorps sont tout de même associés à la ScS et sont non négligeables.

Les anti-U1RNP ciblent les RNP, des ribonucléases impliquées dans l'épissage d'ARN nucléaire en ARN messager (222). On retrouve ces auto-anticorps chez 2 à 14% des patients sclérodermiques (67, 177, 237-239). Ils sont également retrouvés chez des patients atteints de LED et de connectivites mixtes (MCTD; *mixed connective-tissue disease*) (67, 240). Bien que ces patients démontrent une atteinte dermique et une atteinte rénale moins sévères, ils sont pourtant associés à un risque de développer l'HTAP (67). La valeur pronostique des anti-U1RNP est bonne et les patients semblent répondre positivement aux traitements de corticostéroïdes (67, 241).

La très abondante protéine nucléolaire B23 est la cible des anti-B23 retrouvés chez 11% des patients sclérodermiques (242). Cette protéine possède plusieurs fonctions dont le traitement d'ARN ribosomal et l'assemblage des ribosomes (243-245). La protéine B23 est aussi la cible d'auto-anticorps retrouvés dans certains cancers et d'autres désordres immunitaires (246-248). Lorsque retrouvés chez des patients atteints de ScS, les anti-B23 ne sont pas exclusifs. Ils se retrouvent en association avec les anti-fibrillarine (dans 80% des cas) ou les anti-U1RNP (242). Ils sont associés avec une forme de ScS limitée avec atteinte pulmonaire dont le développement d'HTAP (242).

Le *human upstream binding factor* (hUBF) est la cible des anti-hUBF, également connu sous le nom de *nucleolus-organizing region 90* (NOR-90). Ils furent décrits pour la première fois en 1987 (249). Ces auto-anticorps ne sont pas spécifiques à la ScS, ils se retrouvent également dans la PR, le LED, le syndrome de Raynaud, le syndrome de Sjögren ainsi que dans certains cancers (246, 250, 251). Malgré le manque d'étude au niveau de la ScS, il est suggéré que l'anti-hUBF soit associé avec une atteinte cutanée limitée, une

atteinte viscérale modérée et un pronostic favorable (250). Une étude a démontré une association entre l'anti-hUBF et l'allèle HLA-DR1 (252).

4.3. Autres auto-anticorps retrouvés dans la sclérose systémique

D'autres auto-anticorps sont retrouvés dans les séra des patients atteints de ScS mais sans démontrer de valeur prédictive positive. Il n'en demeure pas moins qu'ils sont des sources informatives pour certaines manifestations cliniques associées à la maladie. Ces auto-anticorps ciblent plutôt des antigènes d'origine membranaire, cytoplasmique ou encore extracellulaire.

Tout d'abord, il y a les anticorps anti-cellule endothéliale (AACE). Bien que retrouvés chez 22 à 86% des patients sclérodermiques, on les détecte également dans d'autres connectivites (253-255). Les AACE reconnaissent des protéines à la surface cellulaire des cellules endothéliales (3). La présence de ces auto-anticorps est associée avec une forme de ScS sévère ainsi qu'à une atteinte systémique importante. En effet, ils sont associés avec la présence d'ulcères digitaux, de gangrène, d'HTAP, de fibrose pulmonaire et d'anomalies vasculaires observées par capillaroscopie (256-258). L'importance des AACE serait au niveau de leur rôle pathogène potentiel dans la ScS (3, 259) qui sera davantage explicité dans la section 4.4.

Les anticorps anti-fibroblaste (AAF) sont également des auto-anticorps ciblant la surface d'un type cellulaire impliqué dans la ScS, soit les fibroblastes. La cible exacte des AAF n'est pas identifiée à ce jour. On retrouve des AAF chez environ 40% de patients sclérodermiques avec une prédominance pour les formes diffuses (5, 260). Il a été suggéré que les AAF activent le fibroblaste par l'induction d'expression de molécules d'adhésion ainsi que par la stimulation de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (5). Récemment, une forte corrélation entre les AAF et les AAT fut démontrée chez une cohorte de patients sclérodermiques (261).

Des anticorps contre la protéine fibrilline-1 de la MEC ont été associés avec la ScS dans plusieurs groupes ethniques (262). Leur présence est associée à la forme diffuse de la

ScS ainsi qu'au syndrome CREST (262). Les anti-fibrilline-1 ont été associés avec l'activation du fibroblaste dans la ScS. En effet, ces auto-anticorps induisent la production de composantes de la MEC, dont le collagène, par des fibroblastes normaux, leur conférant un phénotype sclérodermique (7). Cette induction étant inhibée par des anticorps anti-TGF- β ajoutés dans le milieu, il est suggéré que les anti-fibrilline-1 permettent le relâchement de TGF- β libre dans la MEC et que le phénotype sclérodermique des fibroblastes soit induit par celui-ci (7). Les anti-fibrilline-1 furent d'abord détectés chez le modèle sclérodermique murin TSK-1 qui possède une mutation chez le gène codant pour la fibrilline-1 (102, 263).

Les anti-*platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) furent détectés chez l'ensemble d'une cohorte de patients sclérodermiques. De plus, il a été suggéré que les anti-PDGFR avaient un rôle pathogène dans la ScS en stimulant la production de collagène (6). Toutefois, cette étude ne fut guère reproduite par 2 autres groupes (264, 265). Des études subséquentes s'avèrent donc essentielles pour ce groupe d'auto-anticorps.

L'accumulation nette de MEC est le résultat entre sa production et sa dégradation. Ce processus est maintenu grâce aux MMP et aux TIMP. La MMP-1 possède d'importantes activités collagénases. Des anticorps anti-MMP-1 sont présents chez environ 50% des patients sclérodermiques et sont majoritairement associés avec la forme diffuse de la maladie. Ces anticorps sont en mesure d'inhiber l'activité collagénase de la MMP-1. Ils sont corrélés avec l'étendue de la fibrose dermique, pulmonaire et des vaisseaux sanguins rénaux. Ils sont rarement retrouvés dans d'autres maladies auto-immunes (266). La contribution des anti-MMP-1 dans le développement de la fibrose sclérodermique fait partie de nombreuses études (267).

L'auto-antigène nucléaire Ku, cible des anti-Ku, est un hétérodimère (p70/p80) impliqué, entre autres, dans la réparation de l'ADN (268). Les anti-Ku ont d'abord été décrits chez des patients ayant un syndrome de chevauchement polymyosite-ScS (269). Toutefois, dans une large cohorte de patients sclérodermiques d'origine européenne, les anti-Ku furent détectés chez 2,2% des patients (270). Les manifestations cliniques associées à la présence d'anti-Ku sont majoritairement des atteintes musculosquelettiques,

particulièrement des contractions de jointures (270). D'autres études ont associé les anti-Ku avec des atteintes pulmonaires (271). Les anti-Ku sont également retrouvés chez des patients atteints de LED, de MCTD, de syndrome de Raynaud et de PR (272-274).

En somme, de nombreux marqueurs de la ScS sont disponibles et permettent de dépister largement la maladie. Toutefois, la majorité des centres de dépistage se limite à la détection des AAN spécifiques vu leur valeur prédictive très significative pour la ScS.

4.4.Rôles des auto-anticorps

Dans plus de 90% des cas, des auto-anticorps sont détectés dans le sérum des patients sclérodermiques (67, 147). Ils sont d'abord utilisés à titre d'outils diagnostiques et pour leur valeur pronostique puisqu'ils sont associés à différentes manifestations cliniques de la ScS. D'ailleurs, depuis la modification des critères de Le Roy (58), les AAN font partie des critères diagnostiques pour la ScS.

Toutefois, nombreuses sont les études s'intéressant au pouvoir pathogène potentiel des auto-anticorps dans les maladies auto-immunes. À titre d'exemple, il suffit de penser aux anti-ADN double brin dans la néphrite lupique (275-277) et aux anti-Ro dans le bloc auriculo-ventriculaire congénital (278).

Au niveau de la ScS, un nombre croissant d'études suggèrent l'implication de certains auto-anticorps dans la pathophysiologie de la ScS. À titre d'exemple, plusieurs études attribuent un rôle pathogène aux AACE. Le mécanisme pathogène des AACE semble être attribué majoritairement à l'activation des cellules endothéliales ainsi qu'à l'induction de leur apoptose (pour un article de revue, voir (3)). En effet, certains marqueurs endothéliaux sont augmentés suite à l'ajout d'AACE permettant le recrutement de cellules monocytaires (116) ou même l'exposition de phosphatidylsérine à la surface des cellules endothéliales, caractéristique de l'apoptose cellulaire (279). L'apoptose des cellules endothéliales, suite à un transfert direct AACE provenant de patients sclérodermiques, a été démontrée dans le modèle aviaire UCD-200/206. De plus, l'apoptose des cellules endothéliales apparaît comme un événement présent au début de la maladie autant chez ce

modèle expérimental que chez l'humain (108). D'autres auto-anticorps non-spécifiques de la ScS ayant un pouvoir pathogène potentiel ont été précisés dans la section 4.3.

Récemment, il a été démontré que les AAT, auto-anticorps spécifiques associés à la forme diffuse de la ScS, pouvaient lier spécifiquement la surface des fibroblastes dermiques via l'auto-antigène topo lui-même et ainsi favoriser l'adhésion et l'activation de cellules monocytaires (13, 261). Ce recrutement pourrait activer la boucle inflammatoire et mener au développement de la fibrose tissulaire, caractéristique de la ScS. Ces résultats sont encore plus intéressants puisqu'il a récemment été suggéré que le pouvoir pathogène des auto-anticorps est amplifié en présence de l'auto-antigène permettant de former des complexes immuns (280). Il s'agit de la première démonstration que les AAT peuvent contribuer au développement de la ScS.

Suite à la démonstration que l'auto-antigène CENP-B se liait de façon spécifique à la surface des CMLV (9), les AAC ont fait l'objet d'une étude pour établir leur rôle pathogène potentiel dans la ScS (4). Il a donc été démontré que les AAC étaient en mesure de compromettre les fonctions bénéfiques que possède la CENP-B dans un contexte physiologique de réparation de blessure (4).

Rappelons toutefois que selon Naparstek et Plotz, de rigoureux critères doivent être respectés pour considérer un auto-anticorps comme pathogène (281):

- À l'intérieur de modèles expérimentaux, l'auto-anticorps doit être en mesure de causer les lésions retrouvées dans la pathologie;
- Une immunisation produisant ces auto-anticorps doit entraîner le même processus pathologique;
- L'auto-anticorps doit se retrouver au site de dommage caractéristique de la pathologie en présence d'une cible potentielle;
- Les titres d'auto-anticorps doivent, en général, corrélérer avec l'activité de la maladie;
- La résorption de l'auto-anticorps doit être associée à une diminution du processus pathologique.

Malgré que certains de ces critères ne soient pas tous respectés pour les auto-anticorps dans la ScS, plusieurs indices sont en faveur d'un rôle potentiel dans sa pathogenèse (282). En effet, l'observation d'une corrélation entre les titres des anti-topo et la sévérité et l'activité de la maladie (196), leur association avec la fibrose pulmonaire (65) et l'observation d'une amélioration de la fonction pulmonaire et de la survie des patients suite à leur résorption suggèrent un rôle pathogène des anti-topo dans la ScS (197) .

4.5. Origine des auto-anticorps

Les mécanismes exacts entraînant la production d'auto-anticorps chez la grande majorité des patients atteints de ScS demeurent inconnus. Toutefois, le tableau III présente certains mécanismes pouvant être à l'origine de ces auto-anticorps.

Tableau III. Mécanismes à l'origine des auto-anticorps dans la sclérose systémique

- Mimétisme moléculaire
- Altération des auto-antigènes lors de l'apoptose et/ou de la nécrose secondaire
- Relocalisation des auto-antigènes lors d'apoptose cellulaire
- Altération des auto-antigènes lors de conditions ischémiques
- Activation polyclonale des LB

Le modèle du mimétisme moléculaire propose que des antigènes du non-soi possèdent des épitopes similaires à ceux des antigènes du soi. Plusieurs agents infectieux pourraient ainsi contribuer au développement de la ScS. La production d'auto-anticorps serait causée par des similitudes entre l'agent infectieux et certaines composantes du soi. D'ailleurs, des réactions croisées des auto-anticorps présents dans la ScS avec la protéine UL94 du cytomégalo virus ont été observées (283). Dans le même ordre d'idée, des similitudes entre la séquence de la topo, cible des AAT, et la protéine UL70 du cytomégalo virus (284) ainsi que la protéine p30gag de certains rétrovirus (285) furent

démonstrées. Le virus Epstein-Barr ainsi que la protéine P40 du virus de l'herpès de type 1 possèdent respectivement des similitudes avec les portions N- et C-terminales de la protéine fibrillarine, cible de certains auto-anticorps retrouvés dans la ScS (42).

Lors de l'apoptose cellulaire ou de la nécrose secondaire, phénomènes très présents au cours de la ScS (108), des altérations ou encore une relocalisation des auto-antigènes peuvent se produire et induire un bris de tolérance du système immunitaire envers ces auto-antigènes et donc induire l'auto-immunité (voir les sections 5.2 et 6 pour plus de détails).

Un trouble du système immunitaire peut également entraîner la production d'auto-anticorps. Les LB ont fait preuve de nombreux dérèglements dans la ScS. Parmi ceux-ci, on retrouve la surexpression du CD19. Le CD19 est une molécule en surface du LB présente tout au long de sa maturation et régulant de façon positive son activation. Il a d'ailleurs été démontré que la surexpression du CD19 chez un modèle murin entraînait la production d'auto-anticorps (286). Chez certains patients sclérodermiques, le CD19 peut être surexprimé (145). Cette surexpression pourrait être l'une des causes de la production d'auto-anticorps suite à un bris de tolérance envers certains auto-antigènes en périphérie (267). La dysfonction du LB dans les maladies auto-immunes est d'ailleurs la cible d'agent thérapeutique. En effet, l'anticorps monoclonal dirigé contre le CD20 (rituximab) a fait l'objet de nombreuses études et s'est révélé efficace dans le LED (287) et la PR (288, 289). Au niveau de la ScS, les études sont en cours et les résultats préliminaires sont partagés. Toutefois, le nombre limité de cas par étude ne permet pas d'en tirer des conclusions satisfaisantes (290, 291).

5. Les auto-antigènes

Les théories traitant des altérations du système immunitaire ou encore le mimétisme moléculaire sont à la base des explications proposées pour le développement des maladies auto-immunes. Toutefois, ces théories ne sont pas en mesure d'expliquer le répertoire limité et conservé des auto-antigènes ciblés par les auto-anticorps. Ainsi, plusieurs chercheurs

adoptent maintenant la théorie du danger (*danger model*) introduite par Polly Matzinger (20). Cette théorie propose que le système immunitaire réponde à des molécules agissant à titre de signaux d'alarme. Or, l'apparition d'un antigène du soi ou non dans la circulation serait significatif de danger pour l'organisme. Évidemment, l'antigène doit pouvoir activer les CPA pour ensuite initier la cascade immunitaire, incluant LT et LB, jusqu'à la production d'auto-anticorps spécifiques.

Parmi les 20 000 à 60 000 protéines humaines susceptibles d'entraîner une réponse immunitaire adaptative, seulement 1 à 2% correspondent aux antigènes cibles de l'auto-immunité (292). Il en est ainsi dans la majorité des populations étudiées depuis des décennies. Il a donc été proposé que les antigènes cibles possèdent des caractéristiques biochimiques, structurelles ou immunologiques qui influencent leur sélection spécifique et le développement subséquent d'une réponse auto-immune. Ces caractéristiques sont présentées dans le tableau IV et certaines seront davantage explicitées dans les sections suivantes.

Tableau IV. Facteurs influençant la sélection des auto-antigènes**Propriétés structurelles**

- Séquences fortement chargées
- Éléments répétitifs
- Structure en hélice α «coiled-coil»
- Acide nucléique associé

Modifications au cours de la mort cellulaire

- Clivage par les caspases et les granzymes
- Phosphorylation/déphosphorylation
- Transglutamination, ubiquitination, citrullination
- Relocalisation dans les corps apoptotiques
- Relâchement dans le milieu extracellulaire

Concentration et microenvironnement

- Concentration élevée due à une augmentation de l'expression
- Concentration élevée due à la persistance
- Localisation tissu-spécifique

Propriétés immunologiques et pro-inflammatoires

- Chémoattraction
- Liaison directe avec les récepteurs des CPA

Tableau adapté selon Plotz (292).

5.1. Propriétés structurelles et biochimiques

Un premier concept propose que les auto-antigènes possèdent des propriétés structurelles ou biochimiques favorisant le développement d'auto-anticorps spécifiques. En effet, des comparaisons de certains auto-antigènes avec d'autres protéines sélectionnées au hasard ont permis de noter certaines caractéristiques plus fréquemment rencontrées chez les auto-antigènes (292). Ces caractéristiques sont la présence de séquences d'acides aminés fortement chargés, des éléments répétitifs ou des structures en hélices α «coiled-coil»

(292-295). À noter que certaines de ces caractéristiques, telles que la présence de structures en hélice α et des séquences d'acides aminés chargées, se retrouvent au niveau de la protéine nucléaire topo, ciblée dans la forme diffuse de la ScS, pouvant lui conférer un potentiel antigénique élevé (183).

5.2. Altérations au cours de l'apoptose

La mort cellulaire peut être responsable d'altérations des auto-antigènes favorisant leur reconnaissance par le système immunitaire (296, 297). En effet, il a été démontré que certains auto-antigènes associés à la ScS subissaient des clivages protéolytiques au cours de l'apoptose. À titre d'exemple, il a été montré que la topo était clivée par les caspases (298) et par la granzyme B (299). Ce clivage peut mener à la présentation d'épitopes cryptiques, normalement tolérés ou non accessibles aux cellules immunitaires et donc à la formation d'auto-anticorps. Parmi les autres changements que peuvent subir les auto-antigènes durant l'apoptose cellulaire, on retrouve les modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation ou la citrullination (300-302). De plus, lors de l'apoptose cellulaire, plusieurs protéines intracellulaires, altérées ou non, peuvent être relocalisées au niveau de la membrane plasmique ou au niveau des corps apoptotiques. De ce fait, des radicaux libres peuvent venir cliver davantage les protéines et ainsi exposer des épitopes cryptiques (303). Finalement, une libération du contenu cellulaire dans le milieu peut également avoir lieu et favoriser une reconnaissance des auto-antigènes, normalement séquestrés, par le système immunitaire (13).

5.3. Propriétés immunologiques et inflammatoires

Une dernière hypothèse suggérée concerne les fonctions supplémentaires que peuvent acquérir les auto-antigènes une fois libérés dans le milieu extracellulaire. En effet, il a été démontré que certains auto-antigènes possédaient des propriétés chimiotactiques envers certaines cellules leucocytaires en interagissant avec des récepteurs de chimiokines à la surface cellulaire lorsqu'ils se retrouvaient dans le milieu extracellulaire (4, 8, 304, 305).

C'est ainsi que l'acquisition de ces nouvelles fonctions extracellulaires caractérise les auto-antigènes d'être bifonctionnels (voir la section 7).

De ce fait, les auto-antigènes pourraient constituer des signaux de danger capables d'initier les réponses immunitaires innées par leurs propriétés inflammatoires, mais également participer au recrutement de cellules spécialisées telles que les DC et les lymphocytes pour la production des auto-anticorps, caractéristique de l'immunité adaptative. Par conséquent, il est maintenant de plus en plus suggéré que les auto-antigènes sont des éléments actifs dans l'initiation des maladies auto-immunes.

6. La mort cellulaire et l'auto-immunité

La mort cellulaire peut s'effectuer par apoptose ou par nécrose. La mort cellulaire est responsable des altérations cellulaires observées dans la ScS (3, 108). Comme il a été mentionné précédemment, l'apoptose et la nécrose peuvent être à l'origine d'altérations ou de relocalisation des auto-antigènes pouvant mener à la production d'auto-anticorps mais peuvent également participer à la libération de certains auto-antigènes dans le milieu extracellulaire. Finalement, une fois dans le milieu extracellulaire, certains auto-antigènes peuvent accomplir leurs nouvelles fonctions. Une description sommaire des 2 phénomènes de mort cellulaire sera présentée dans cette section.

En premier lieu, la nécrose cellulaire est un phénomène de mort cellulaire désordonnée pouvant résulter d'une lésion, d'un traumatisme cellulaire toxique ou mécanique ou même d'apoptose. Les changements morphologiques associés à la nécrose sont l'augmentation du volume cellulaire, la perte de l'intégrité membranaire, la fragmentation aléatoire de l'ADN et surtout la libération du contenu cellulaire dans l'environnement extracellulaire suite à l'éclatement de la cellule. Le relâchement du contenu cellulaire est la cause des dommages tissulaires et de l'inflammation localisée observés lors de la mort cellulaire par nécrose (306).

Quant à l'apoptose, on la qualifie plutôt de mort cellulaire programmée et propre puisque le contenu cellulaire n'est pas relâché dans l'environnement extracellulaire. Elle se produit dans un contexte physiologique normal, par exemple dans le but de maintenir un nombre cellulaire constant. L'apoptose peut être induite par des stimuli intrinsèques ou extrinsèques. Dans les 2 cas, il y a activation des caspases qui participent à la destruction de certains organites intracellulaires. La cellule qui entre en apoptose subit des modifications morphologiques incluant une diminution du volume cellulaire, une modification du cytosquelette résultat du bourgeonnement membranaire (*blebbing*), une condensation de la chromatine et une dégradation de l'ADN. Ces bourgeons membranaires ou corps apoptotiques contiennent des organites intacts et se dissocient de la cellule en apoptose tout en maintenant l'intégrité membranaire. En conditions normales, les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés par des macrophages ou d'autres cellules avoisinantes.

Dans certaines conditions, l'élimination des corps apoptotiques peut être déficiente et favoriser la persistance de ceux-ci dans le milieu extracellulaire. Il s'ensuit de la nécrose ce qui contribue au développement d'un environnement inflammatoire ainsi qu'à des dommages tissulaires. Dans la littérature, on nomme ce processus : nécrose secondaire ou apoptose tardive (307, 308). Cette déficience de la clairance des corps apoptotiques peut être la cause d'une apoptose accrue dépassant les capacités phagocytaires du moment (308). Le contenu des corps apoptotiques persistants peut donc être mis en contact avec les cellules immunitaires et être perçu comme des signaux de danger (280, 308). Dans ce cas, leur phagocytose par les CD immatures permettrait leur présentation aux LT ce qui entraînerait la production éventuelle d'auto-anticorps (307). Parallèlement, certains clivages protéolytiques additionnels permettent la création de nouveaux auto-antigènes (309). La nécrose secondaire, résultat d'une clairance déficiente des corps apoptotiques, peut donc contribuer au bris de tolérance du soi et par conséquent au développement des maladies auto-immunes.

7. Les auto-antigènes bifonctionnels

La libération des auto-antigènes dans le milieu extracellulaire leur confère la possibilité d'avoir de nouvelles fonctions sur les cellules avoisinantes ce qui leur permet d'agir activement dans le développement des réactions immunitaires. Cette caractéristique de bifonctionnalité est de plus en plus retrouvée dans la littérature et il est suggéré que les auto-antigènes participent à un processus normal de réparation de blessure en ayant des fonctions apparentées à celles des cytokines lorsqu'ils se retrouvent dans le milieu extracellulaire.

Un auto-antigène bifonctionnel bien connu est la protéine *High mobility group box-1* (HMGB1). Cette protéine dont la fonction primaire réside dans le maintien de la structure des nucléosomes et dans la régulation de la transcription génique possède des fonctions additionnelles lorsque libérée dans le milieu extracellulaire suite à une nécrose ou à des dommages cellulaires (11, 310). Une fois relâché dans la circulation, cet auto-antigène agit à titre de cytokine pro-inflammatoire. L'interaction avec son récepteur, RAGE (*receptor for advanced glycation end products*), entraîne la migration de certains types cellulaires tels les fibroblastes et les CMLV, l'activation des cellules endothéliales, la maturation des CD et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires entre autres par les monocytes/macrophages (11, 311-314). De plus, la HMGB1 est ciblée chez certains patients atteints de ScS puisque des anti-HMGB1 ont été retrouvés dans leurs séra (315).

Environ 15 à 25% des patients atteints de polymyosite ou de dermatomyosite possèdent des auto-anticorps contre 2 auto-antigènes de la famille des aminoacyl-tRNA synthétases, soit l'histidyl-tRNA synthétase et l'asparaginyln-tRNA synthétase (8). Il a été démontré que ces 2 auto-antigènes possèdent également des propriétés chimiotactiques envers les LT, les monocytes et les CD immatures en interagissant avec le *CC chemokine receptor 5* (CCR5) et le CCR3. De façon intéressante, deux enzymes de la famille des aminoacyl-tRNA synthétases, n'étant pas ciblées par des auto-anticorps, n'ont pas démontré de propriétés chimiotactiques sur ces mêmes populations cellulaires. De plus, dans des biopsies de tissus affectés, on retrouve des cellules exprimant le CCR5 et CCR3

ce qui suggère que ces auto-antigènes peuvent participer à l'initiation de la réponse immunitaire adaptative et à la production d'auto-anticorps (8). Suite à ces résultats, de nombreuses études ont été entreprises dans le but de trouver d'autres auto-antigènes démontrant des fonctions chimiotactiques similaires aux 2 tRNA-synthétases. Plusieurs ont démontré des propriétés chimiotactiques similaires dont 2 auto-antigènes associés à la ScS, soit la fibrillarine et la topo (10). Plus récemment, un autre auto-antigène ciblé dans la ScS a été ajouté à la liste des auto-antigènes bifonctionnels, soit la CENP-B (9). Cette protéine possède des fonctions apparentées aux cytokines qui sont le résultat d'une liaison spécifique aux CMLV via le CCR3 lorsqu'elle est libérée dans le milieu extracellulaire (4).

Comme il a été mentionné, la topo possède des propriétés chimiotactiques pour certaines cellules immunitaires, dont les CD immatures et les monocytes (10). De plus, il a été démontré que les monocytes étaient recrutés et activés par le complexe immunitaire topo/anti-topo lié à la surface des fibroblastes. La topo permet donc, en présence d'anti-topo, de participer au développement d'un contexte inflammatoire (13). Suite à ces résultats, il est probable que la topo puisse s'ajouter à la liste des auto-antigènes bifonctionnels.

Ainsi donc, plusieurs auto-antigènes sont chimiotactiques pour les CD immatures. Rappelons que les CD sont des cellules professionnelles de la présentation des antigènes aux autres cellules immunitaires. Selon les dernières études, les auto-antigènes, lorsque libérés dans le milieu extracellulaire, pourraient recruter les CD ainsi que d'autres cellules immunitaires exprimant le récepteur approprié. Ils participeraient donc activement à l'infiltration cellulaire au site de lésion cellulaire, à la réponse inflammatoire et à la présentation antigénique par les CD. Ces conditions pourraient contribuer au développement de maladies auto-immunes chez certains individus.

8. Les récepteurs des chimiokines

Il existe plusieurs familles de récepteurs responsables de la liaison de ligands à la surface cellulaire, dont la plus importante chez les mammifères est représentée par les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG). Parmi les ligands des RCPG, on y retrouve les chimiokines. Ces récepteurs sont impliqués dans la régulation d'une grande variété de processus physiologiques dont la migration cellulaire. Suite à la liaison d'une chimiokine à son RCPG, un changement conformationnel permettant l'activation de la protéine G hétérotrimérique, composée des sous-unités α , β et γ , sur le feuillet interne de la membrane cellulaire se produit. Dans la forme inactive, une molécule de GDP (guanosine diphosphate) est liée à la sous-unité $G\alpha$ mais, suite à son activation, un échange pour une molécule de GTP (guanosine triphosphate) s'effectue. Par le fait même, il se produit une dissociation entre les sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$. Chacune de ces sous-unités peut donc activer différents effecteurs cellulaires. La durée du signal dépend de l'activité intrinsèque GTPasique de la sous-unité $G\alpha$ qui permet l'hydrolyse du GTP et la réassociation des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ (316, 317). La stimulation du RCPG entraîne également une régulation de son activité. En effet, le RCPG devient réfractaire à son ligand ce qui permet de limiter les stimulations prolongées. Pour ce faire, le RCPG peut être phosphorylé, internalisé par endocytose ou encore son exposition à la surface cellulaire peut être diminuée, i.e. une *down-regulation* (317, 318).

L'interaction d'un ligand avec son RCPG entraîne l'activation ou l'inhibition d'effecteurs de voies de signalisation intracellulaires. La sous-unité $G\alpha$ permet l'activation d'une grande variété de voies de signalisations puisqu'il existe plusieurs familles de la sous-unité $G\alpha$. Parmi celles-ci, on compte la $G\alpha_s$ pour l'activation de l'adénylate cyclase, la $G\alpha_i$ pour l'inhibition de l'adénylate cyclase, la $G\alpha_q$ pour l'activation de la phospholipase $C\beta$ s et finalement la $G\alpha_{12}$ impliquée dans l'activation de la famille des protéines Rho (316, 317). Quant à la sous-unité $G\beta\gamma$, elle permet l'activation de la voie des phospholipases $C\beta$ (β_1 , β_2 et β_3) et la PI3K (phosphoinositide 3-kinase). Les voies de signalisations activées

par les sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ peuvent mener à l'activation des MAPK (*mitogen-activated-protein kinase*) par l'entremise de nombreux candidats intracellulaires intermédiaires en amont (316, 317). Finalement, un phénomène de transactivation de récepteurs à activité tyrosine kinase est attribué aux RCPG suite à la liaison de certains ligands (319-321).

9. Les protéoglycans

Les protéoglycans (PG) sont des constituants ubiquitaires retrouvés dans la MEC et à la surface cellulaire. On retrouve différentes catégories de PG, mais la présente section traitera seulement des PG de surface. En effet, une portion des protéines membranaires possèdent une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycans (GAG) qui y sont attachées de façon covalente. Dans cette catégorie, on retrouve les PG transmembranaires, par exemple les syndécans, et les PG ancrés à la membrane via un lien glycosyl-phosphatidylinositol, par exemple les glypicans (322).

Concernant les GAG qui sont attachés aux PG, on en retrouve 2 familles. D'abord, il y a les GAG sulfatés comprenant les héparanes sulfates (HS), l'héparine, les dermatanes sulfates, les kératanes sulfates et les chondroïtines sulfates. Ensuite, les GAG non-sulfatés comme l'hyaluronane. Par ailleurs, l'hyaluronane n'est pas rattaché à une protéine membranaire et donc ne fait pas partie de la famille des PG de surface (322). Globalement, les chaînes de GAG sont des répétitions de disaccharides. Ils se composent de sucres aminés (osamines) (N-acétyl-D-glucosamine ou N-acétyl-D-galactosamine), d'acide uronique (acide D-glucuronique ou L-iduronique) ou de galactose (323). De nombreuses modifications biochimiques, sulfatation, déacétylation et épimérisation, s'effectuent sur la chaîne de GAG permettant de les distinguer entre elles et de devenir spécifique pour la liaison des ligands (323-325).

Les PG sont des molécules de surface impliqués dans plusieurs processus biologiques puisqu'ils sont capables de lier plusieurs ligands tels que des protéines de la

MEC, des cytokines, des chimiokines, des molécules d'adhésion cellulaire ou encore des facteurs de croissance.

9.1. Les protéoglycans à chaînes d'héparanes sulfates

Les PG ayant comme GAG d'attachés des chaînes d'HS (HSPG) représentent une famille importante de protéoglycans. Ils sont abondants à la surface cellulaire et peuvent en effet se retrouver au nombre de 10^6 molécules par cellule (325, 326). Les HS sont des polysaccharides (environ 50 à 400 monosaccharides) constitués d'une alternance d'acide uronique et de glucosamine. Comme les autres GAG, la chaîne d'HS est modifiée par certaines enzymes. Il a été démontré que ces modifications varient selon l'espèce et la source tissulaire ou cellulaire étudiées (327, 328). Les différences observées soutiennent l'idée d'une spécificité sélective pour la liaison des différents ligands (325).

On retrouve 2 familles majoritaires d'HSPG liés à la surface cellulaire, soit les syndécans et les glypicans. Tel que mentionné précédemment, les syndécans sont des PG transmembranaires et à ce jour, on dénombre 4 syndécans chez les mammifères. Ils possèdent constitutivement entre 3 à 5 chaînes distales d'HS linéaires. Dans certains tissus, on retrouve des syndécans hybrides présentant également des chaînes de chondroïtines sulfates, plutôt proximales. Les syndécans possèdent de courts segments intracellulaires qui peuvent interagir avec des protéines intracellulaires et peuvent également être internalisés par endocytose. Ils possèdent également des sites de clivage protéolytique pouvant mener au relâchement des ectodomains de la surface cellulaire (329). Quant aux glypicans, ils sont au nombre de 6 chez les mammifères et sont liés à la membrane par un lien GPI. Ils se présentent structurellement comme des ectodomains globulaires possédant 2 à 3 chaînes proximales d'HS. Tout comme les syndécans, ils peuvent être clivés ou dégradés suite à une internalisation (324). À titre informatif, on retrouve d'autres HSPG liés à la surface cellulaire (CD44, betaglycan), mais de façon minoritaire, ainsi qu'associés aux membranes basales (perlecan, agrin) (330).

Dans de nombreux cas de complexe ligand/récepteur, le ligand va d'abord lier la surface cellulaire en interagissant avec une molécule très abondante mais avec une faible affinité et ensuite lier avec une forte affinité son récepteur approprié pour déclencher une cascade de signalisation (331). Le récepteur de faible affinité le plus commun est l'HSPG. Il est d'ailleurs connu pour son implication dans la liaison de nombreux facteurs de croissance et de chimiokines (331).

Par ailleurs, les *fibroblast growth factors* (FGF) représentent les facteurs de croissance les plus étudiés à titre de molécules liant l'héparine et les HSPG. En effet, il est bien connu que les HSPG jouent un rôle important dans l'interaction du FGF avec son récepteur tyrosine kinase (332). Il a été démontré que le FGF, en l'absence d'HS, peut former un complexe de faible affinité avec son récepteur (complexe minimal). Ce complexe entraîne l'activation du récepteur en présence d'une forte concentration du ligand. Toutefois, en présence d'HSPG approprié, le complexe devient fortement stabilisé et activé et une liaison subséquente d'une seconde molécule de ligand est également possible (332). Ainsi, la présence d'HSPG n'est pas essentielle pour la liaison du FGF mais permet la formation d'un complexe de haute affinité malgré une faible concentration du ligand (324).

Les chimiokines sont des cytokines chimiotactiques qui induisent leurs effets cellulaires suite à la liaison à des RCPG, les CCR. Les chimiokines sont également en mesure de lier les GAG à la surface cellulaire, particulièrement les HS. Par exemple, il a été démontré que les GAG participent à l'oligomérisation des chimiokines leur permettant d'augmenter leurs liaisons sur leurs RCPG respectifs (333). En effet, l'élimination des GAG à la surface cellulaire entraîne une forte diminution de la liaison de certaines chimiokines à leur RCPG. Les GAG présents en surface cellulaire servent, ici encore, à augmenter la concentration locale des chimiokines (333) mais certains, dont les HS, semblent être essentiels pour que les chimiokines accomplissent leurs fonctions dans un contexte inflammatoire (330). De plus, puisque la composition des GAG à la surface cellulaire varie selon le tissu et le type cellulaire, cela permet un contrôle spécifique des chimiokines immobilisées.

9.2.L'héparine

L'héparine est un GAG analogue aux HS. Toutefois, elle est davantage sulfatée et possède plus d'acide iduronique. L'héparine est également beaucoup moins abondante *in vivo* que les HS. Elle se retrouve dans les granules des mastocytes, cellules du tissu conjonctif (334). L'héparine est surtout connue pour ses propriétés thérapeutiques anticoagulantes.

On retrouve plusieurs types d'héparines utilisées à des fins thérapeutiques. Elles proviennent majoritairement de muqueuses intestinales de porc ou de poumons bovins. On peut diviser les héparines en 3 groupes selon leur structure. D'abord l'héparine non-fractionnée (HNF) correspond à un mélange hétérogène de GAG de poids variant de 3 à 30 kDa et constitué d'environ 45 monosaccharides. Son activité anticoagulante s'effectue grâce à l'intermédiaire d'un cofacteur plasmatique, l'antithrombine (AT). L'héparine possède une séquence pentasaccharidique permettant de lier spécifiquement l'AT et ainsi inhiber plusieurs facteurs de coagulation. La portion ne liant pas l'AT peut également posséder des activités anticoagulantes via l'inhibition de d'autres facteurs (334, 335).

Le deuxième groupe correspond aux héparines fractionnées ou à bas poids moléculaires (HBPM). Elles sont obtenues suite à des dépolymérisations enzymatiques ou chimiques de l'héparine. Elles correspondent donc à un mélange de fragments d'héparines constitués d'environ 15 monosaccharides, tous possédant la séquence de liaison à l'AT. De ce fait, les HBPM permettent d'activer plus spécifiquement l'antithrombine puisqu'il n'est pas toujours possible de lier également la thrombine et de l'inactiver directement. Parmi les HBPM les plus communes, on retrouve l'énoxaparine (Lovenox®), le nadroparin (Fraxiparin®), la daltéparine (Fragmin®) et le tinzaparin (Innohep®).

Finalement, on peut ajouter les héparines synthétiques dont fait partie le fondaparinux (Arixtra®). Il s'agit d'une molécule constituée de la séquence pentasaccharidique spécifique pour la liaison à l'antithrombine. Elle a donc une spécificité pour l'activation de l'antithrombine seulement. Ainsi, les effets anticoagulants des différentes héparines sont grandement associés à sa structure.

Outre ses activités anticoagulantes, l'héparine possède également des propriétés anti-inflammatoires et anti-fibrotiques suscitant un intérêt particulier depuis quelques années. D'ailleurs, ces propriétés anti-inflammatoires ont été démontrées dans plusieurs études. À titre d'exemple, l'administration d'héparine chez des patients asthmatiques (336), atteints de maladie intestinale inflammatoire (337), dans une cohorte de patients atteints du syndrome de Raynaud (338) ont tous conclu positivement quant à l'utilisation d'héparine pour la diminution du contexte inflammatoire. Il a également été démontré que l'administration d'héparine réduisait le dépôt de collagène dans un modèle animal de myocardite (339) ou encore une diminution de fibrose hépatique chez des patients atteints d'hépatites (340, 341). Toutefois, aucune donnée ou essai thérapeutique n'est présentement disponible concernant un rôle potentiellement anti-fibrotique pour la ScS.

Les effets anti-inflammatoires ou anti-fibrotiques de l'héparine représentent donc une voie thérapeutique suscitant de plus en plus d'intérêt puisqu'ils permettent de moduler les effets des molécules pouvant lier l'héparine ou les HS.

Résultats

Article no. 1 : L'auto-antigène ADN topoisomérase I interagit avec le récepteur de chimiokine 7 (CCR7) et influence la physiologie du fibroblaste dermique

Article prêt pour une soumission dans : *Arthritis & Rheumatism*

Présentation de l'article no. 1

De nombreuses études ont démontré des rôles supplémentaires des auto-antigènes associés aux maladies auto-immunes lorsqu'ils sont relâchés dans le milieu extracellulaire (8-11, 304, 310). En effet, plusieurs auto-antigènes induisent des phénomènes inflammatoires via des récepteurs de chimiokines (4, 8, 304, 305).

L'ADN topoisomérase I (topo) est un auto-antigène nucléaire ciblé par les auto-anticorps anti-topo dans la forme diffuse de la sclérose systémique (ScS), caractérisée par une importante atteinte dermique (55). La topo est libérée dans le milieu extracellulaire, suite à l'apoptose des cellules endothéliales, et se lie de façon spécifique à la surface des fibroblastes (13). Le but de la présente étude était de déterminer les effets biologiques de la liaison de la topo sur le fibroblaste et d'en identifier la cible.

Dans cette étude, nous avons démontré que, suite à la liaison de la topo à la surface des fibroblastes dermiques, celle-ci en influence la physiologie en activant des voies de signalisations intracellulaires favorisant la migration cellulaire, dans un contexte de réparation de blessure. Des études *in vitro* ont permis d'observer une interaction directe de la topo avec le récepteur de chimiokine 7 (CCR7). Le CCL21, agoniste du CCR7, inhibe cette interaction et interfère également avec la liaison de la topo à la surface du fibroblaste.

Ces résultats suggèrent donc pour la première fois que l'auto-antigène topo possède des rôles extracellulaires qui influencent la physiologie des fibroblastes. Ces fonctions additionnelles soutiennent que la topo peut participer à un mécanisme de réparation de blessure lorsque libérée dans le milieu extracellulaire. De plus, les résultats présentés suggèrent une interaction de la topo avec le récepteur du CCL21, le CCR7. L'identification de la cible de la topo en surface cellulaire ouvre la voie à l'étude de la pathophysiologie de la ScS et du rôle pathogène potentiel des anti-topo.

Contribution des auteurs à l'article no.1 :

- J.A. : Élaboration du protocole expérimental; collecte et analyse scientifique et statistiques des résultats expérimentaux; rédaction de l'article.
- G.R. : Élaboration du protocole expérimental; collecte et analyse scientifique et statistiques des résultats expérimentaux.
- M.K. : Élaboration du protocole expérimental ; analyse scientifique des résultats.
- J.-L.S. : Élaboration du protocole expérimental ; analyse scientifique des résultats; rédaction de l'article.
- Y.R. : Élaboration du protocole expérimental; analyse scientifique des résultats; rédaction de l'article.

**ARTICLE NO. 1 : THE AUTOANTIGEN DNA TOPOISOMERASE I
INTERACTS WITH CHEMOKINE RECEPTOR 7 AND
EXERTS CYTOKINE-LIKE EFFECTS ON DERMAL
FIBROBLASTS**

**Authors: Julie Arcand, Geneviève Robitaille, Martial Koenig, Jean-Luc
Senécal and Yves Raymond**

Julie Arcand, BSc, PhD candidate, Geneviève Robitaille, PhD, Martial Koenig, MD, Assistant Professor of Medicine, Jean-Luc Senécal, MD, FRCPC, FACP, Professor of Medicine, Yves Raymond, PhD, Professor of Medicine

Laboratory for Research in Autoimmunity, Notre-Dame Hospital, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; and Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Supported by grants MOP-68966 and MOP-81252 (JLS, YR) from the Canadian Institutes of Health Research, by grants from Sclérodermie Québec (JLS, YR, MK), and by studentships (JA) from Sclérodermie Québec and Université de Montréal

Running head: Topo exerts cytokine-like effects on fibroblasts via CCR7

Address correspondence and reprint requests to:

Yves Raymond, PhD

Laboratory for Research in Autoimmunity

Notre-Dame Hospital, CHUM

1560 Sherbrooke East

Montreal QC H2L 4M1

Canada

Phone: 514-890-8000 ext. 25481

Objective: Previous studies have demonstrated that the systemic sclerosis (SSc)-associated autoantigen DNA topoisomerase I (topo) bound specifically to the surface of fibroblasts once released in the extracellular environment via an unknown receptor. We extended these results by identifying topo-mediated cellular effects and characterizing topo's specific target on fibroblast surfaces.

Methods: Purified topo was used to investigate intracellular signalling pathways activation and tested for cell migration. To demonstrate the expression of specific chemokine receptors on fibroblasts, immunoblotting and flow cytometry analysis were performed. To evaluate direct interaction between chemokine receptor and topo, a protein-protein based ELISA was used. Finally, topo coupled to the PE fluorochrome was used to investigate competition of topo specific binding on fibroblast surfaces with chemokine ligand.

Results: Topo stimulated the phosphorylation of phospholipase C γ 1, c-Raf, ERK 1/2 and p38 MAPK, intracellular signalling pathways that stimulated fibroblast migration via a G $_{\alpha i}$ protein-coupled receptor. CCR7 was found to interact directly with topo. Furthermore, its ligand CCL21 competed *in vitro* for this interaction and *in vivo* with topo-PE binding to fibroblast surfaces.

Conclusion: These new roles of topo in fibroblast physiology and the identification of its target on cell surface open up new perspectives of study in the field of SSc-associated anti-topo autoantibodies.

DNA topoisomerase I (topo) is a nuclear enzyme targeted by anti-topo autoantibodies particularly in the diffuse form of the autoimmune disease systemic sclerosis (SSc). The presence of anti-topo autoantibodies is strongly correlated with extensive cutaneous fibrosis and disease severity (342). Recent studies have demonstrated that topo is released into the extracellular medium by apoptotic cells and that it binds specifically to fibroblast surfaces but neither to endothelial nor to smooth muscle cell surfaces (13). Furthermore, fibroblast-bound topo then leads to the recruitment of anti-topo autoantibodies from SSc patients, a process that leads to the adhesion and activation of monocyte cells (13).

Recently, a number of autoantigens were shown to play novel roles in the extracellular medium where they are released and have thus been described as bifunctional molecules (8, 11, 304, 310). These autoantigens act as tissue-specific chemoattractants by interacting with cell membrane receptors (8, 10, 304, 310). Moreover, another SSc-associated autoantigen, namely centromeric protein B (CENP-B), was recently added to this group of bifunctional molecules (9) and was demonstrated to activate intracellular signalling pathways via chemokine receptors, which are a subfamily of the G-protein coupled receptors (GPCR) (4, 8, 304, 305, 310). In view of the direct effects of the CENP-B autoantigen on its target cells (4, 9), the question could be raised as to possible direct effects of topo on fibroblasts.

Like other chemokine receptors, chemokine receptor 7 (CCR7) contains seven transmembrane domains and mediates its signals through heterotrimeric G proteins and their downstream effectors (343). CCR7 was described as a potent leukocyte chemotactic receptor playing an important role in the initiation of the immune response and later described to regulate the homing of immune cells such as T cells and dendritic cells towards secondary lymphoid organs (343, 344). However, it was recently demonstrated that CCR7 is expressed on other cell types (345-348) and appears heavily involved in the development of fibrosis following stimulation by its exclusive ligands, CC-chemokine ligand 19 (CCL19) and 21 (CCL21) (343, 346, 348-352). Indeed, CCL21 was demonstrated

to significantly modulate the migratory and proliferative abilities of fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis samples which expressed CCR7 (348). Furthermore, targeting CCL21 or CCR7 abrogates pulmonary fibrosis in an immunodeficient mice model (352) which strongly demonstrated a major role for this ligand and receptor pair in pulmonary fibrosis.

The aim of the present study was to investigate the extracellular role of topo in the normal physiology of the fibroblast. Evidence is presented here for a direct effect of topo in fibroblast physiology leading to the stimulation of migration and for a direct interaction of topo with CCR7.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and reagents. Normal human dermal fibroblasts (NHDF) from adults and their culture media were from Lonza (Walkersville, MD). NHDF were cultured in fibroblast basal medium supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS), 5 µg/ml of bovine insulin, 1 ng/ml of human fibroblast growth factor B, 50 µg/ml of gentamicin sulfate and 100 µg/ml penicillin-streptomycin (Wisent Inc., St-Bruno, Canada). Cells were used at passage 5. Cells were grown at 37°C in air with 5% CO₂. Subculturing was achieved before confluency, using trypsin and trypsin-neutralizing solution (Lonza). DNA topoisomerase I (topo; purified from rabbit thymus) was obtained from Immunovision (Springdale, AR). All cell signalling antibodies were obtained from Cell Signalling Technology (Beverly, MA). Anti-human β-tubulin 1 antibody, pertussis toxin (PTX) and platelet-derived-growth-factor-BB (PDGF-BB) were purchased from Sigma (Oakville, Ontario, Canada). Chemokine receptor 7 (CCR7) GST-coupled protein and monoclonal anti-CCR7 antibody (clone Y59 and E75) were purchased from Epitomics (Burlingame, CA), chemokine ligand 21 (CCL21) and chemokine ligand 19 (CCL19) were from R&D (Minneapolis, MN), GST protein and anti-GST antibody from Abcam (Cambridge, MA).

Wound healing assay. The procedure was performed as described (9) with minor changes. NHDF were grown to confluence on glass coverslips in 12-well plates and adapted to 0.5% serum for 24 hours before the assay. Where necessary, cells were pretreated with PTX (100 ng/ml) for 16 hours. The cell monolayer was wounded by scraping with a sterile micropipette tip. The injured monolayers were washed twice with PBS and allowed to recover for 6 hours in 0.5% serum containing medium supplemented with topo dialysed against PBS or with PDGF-BB as a positive control. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde (PFA) for 5 minutes at 4°C, permeabilized with acetone for 5 minutes at -20°C, and stained with rhodamine-phalloidin (Sigma) and Hoechst 33258

(Sigma) in PBS with 3% BSA. Cells were examined with an Eclipse E600 fluorescence microscope (Nikon, Melville, NY) using NIS-elements 3.0 Ar software (Nikon, Melville, NY). Quantitation was performed on photographs taken with a photometrics HQ² coolSNAP camera (Tucson, AZ), by counting the number of Hoechst-stained nuclei from cells that had migrated into the cell-free space. Four fields per coverslip were evaluated, and all experiments were performed in duplicate. The migration index is defined as the number of cells having migrated under different experimental conditions divided by the number of cells present in the denuded control area in the absence of stimulant, i.e. spontaneous migration.

Protein analysis. Cells were serum-starved for 48 hours before being incubated with topo (10 ng/ml) dialysed against PBS. In some cases, cells were treated with PTX (100 ng/ml) for 16 hours before being incubated with topo. Cells were washed and lysed in lysis buffer (20 mM MOPS, pH 7.0, 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 30 mM sodium fluoride, 60 mM β -glycerophosphate, pH 7.2, 20 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 3 mM benzamidine, 5 μ M pepstatin A, 10 μ M leupeptin and 1 mM dithiothreitol), sonicated and clarified by centrifugation. Proteins from whole cell lysates were quantitated using the Bradford dye-binding procedure (BioRad, Hercules, CA) and equal amounts (25 μ g) of protein were subjected to SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Biorad). Protein lysates were analysed with antibodies against phospho-phospholipase C γ 1 (PLC γ 1 Y783), phospho-c-Raf (S338), phospho-extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK 1/2 T202/204) and phospho-p38 (T180/182) and CCR7 (Y59) according to the manufacturer's instructions. Probing with anti-human β -tubulin 1 antibody was used to control the loading for each immunoblot. Antibody binding was detected by chemiluminescence with SuperSignal West Pico (Pierce).

Flow cytometry. Cells were grown until confluence and detached with phosphate buffered saline (PBS)/13 mM ethylene diamine tetra acetate (EDTA) and washed with PBS (Wisent Inc.). Where required, topo or BSA was coupled to the PE (phycoerythrin) fluorochrome using the Lightning-Link PE Conjugation Kit from Innova Biosciences (Babraham, Cambridge, UK) according to manufacturer's instructions. Topo binding was assessed by incubating the cells with topo-PE (1.0 $\mu\text{g/ml}$) for 30 minutes at 25°C in PBS/3% BSA, cells were washed with PBS and fixed with 1% PFA for 5 minutes at 4°C. Where required CCL19 and 21 were added simultaneously with topo-PE to cells for the indicated concentration and incubated 30 min at 25°C. Anti-CCR7 monoclonal rabbit antibody (E75) was used to label cells diluted in PBS/3% BSA. Irrelevant IgG from rabbit serum (Sigma) was used as an isotype control. Immunoglobulin binding was revealed with PE-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, PA). Where required, cell permeability was assessed by the addition of 7-aminoactinomycin D (Sigma), and permeable cells were gated out. Fluorescence was detected on a FACScan and analyzed by CellQuest software (BD Biosciences, San Jose, CA).

Protein-based enzyme-linked immunosorbant assay. Topo (350 ng) diluted in coating buffer (15 mM Na_2CO_3 + 35 mM NaHCO_3 , pH 9.6) was coated in a 96 well-plate for 1 hour at 37°C. After washes with PBS/0.5% Tween 20, all wells were blocked with PBS containing 2% fetal bovine serum, 1% bovine serum albumin and 0.5% Tween 20 for 16 hours at 37°C. The CCR7 GST-coupled protein was added to corresponding wells in blocking buffer for 1 hour at 37°C. Where required, increasing amounts of CCL21 was preincubated with CCR7-GST (1.5 $\mu\text{g/ml}$) for 30 minutes prior to incubation with immobilized topo. Anti-GST antibody was added to corresponding wells and the binding was revealed with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-GST diluted in blocking buffer and *o*-phenylenediamine (Sigma) substrate diluted at 0.8 mg/ml in citrate buffer, pH 6, and 0.006% H_2O_2 . The reaction was stopped by the addition of 2M H_2SO_4 and the

optical density was read with a microplate reader (Dynex, Chantilly, VA) at 490 nm. All conditions were read in duplicate and subtracted from a control well without CCR7 protein.

Statistical analyses. Student's two-tailed unpaired t test was used in all statistical analysis. Statistical tests were performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). P-values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Topo stimulates the migration of fibroblasts. Fibroblasts play essential roles in cutaneous wound repair and remodelling (353). They proliferate to expand, migrate into the wound bed, synthesize new extracellular matrix and express thick actin bundles as myofibroblasts. Hence, we investigated whether topo could be a migratory factor for fibroblasts in an *in vitro* wound healing assay. After scraping the monolayer to induce a wound response, fibroblasts were stimulated for 6 hours with topo. The effect of topo stimulation was compared to that of a growth factor known to affect fibroblast motility, namely PDGF-BB (354). Migration into the denuded cell area under different topo concentrations was observed (Figure 1A) and reported as a migration index relative to the vehicle-treated cells, i.e. spontaneous migration (Figure 1B). Topo potently stimulated NHDF migration starting at doses as low as 10 ng/ml relative to the vehicle-treated cells (Figure 1B), an effect comparable to that of platelet-derived growth factor-BB at 10 ng/ml. These data suggest that normal wound repair can be positively stimulated by topo.

Phosphorylation of PLC γ 1, c-Raf, ERK 1/2 and p38 MAPK are stimulated by topo. Topo-mediated NHDF migration must involve the stimulation of intracellular signalling pathways. For example, mitogen-activated-protein-kinases (MAPK), such as ERK1/2 and p38, play crucial roles in cell migration (355, 356). To determine whether MAPK intracellular signalling pathways were involved here, NHDF were stimulated with topo and whole cell lysates were resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with phospho-specific antibodies. An anti- β -tubulin 1 antibody was used to control for the loading on each immunoblot. As shown in Figure 2, topo treatment resulted in rapid phosphorylation of ERK1/2 and p38. Indeed, increased ERK1/2 phosphorylation was detected as early as 1 minute, with maximal increases occurring at 5 minutes of treatment, whereas the p38 MAPK response occurred after 5 minutes, with maximal induction

achieved after 10 minutes of treatment and declining thereafter. Therefore, the implication of the upstream regulator of the vertebrate MAP kinase (ERK) signaling cascade, c-Raf (Raf-1), was investigated. C-Raf directly phosphorylates and activates the protein kinase MEK, which in turn phosphorylates and activates ERK1 and ERK2 (357). Indeed, c-Raf activation was observed in a time-dependent manner that was evident after 5 minutes of stimulation with topo (Figure 2). The phospholipase $\text{C}\gamma 1$ ($\text{PLC}\gamma 1$) has been proposed as a molecule that regulates cytoskeleton reorganization, cell adhesion and migration (358) by activating signalling pathways such as MAPKs (359). Since the MAPKs were stimulated by topo, activation of $\text{PLC}\gamma 1$ was also investigated. As shown in Figure 2, $\text{PLC}\gamma 1$ was phosphorylated by topo within 2 minutes to reach a maximum after 10 minutes of stimulation, similarly to c-Raf. These results suggest that topo stimulates the activation of intracellular signalling pathways leading to fibroblast migration.

Topo stimulates fibroblasts via a $\text{G}\alpha_i$ protein-coupled receptor. Recently, a number of autoantigens have been shown to act as tissue-specific chemoattractants by interacting with cell membrane receptors (10). Moreover, they can activate intracellular signalling pathways via chemokine receptors, which are a subfamily of the G-protein coupled receptors (GPCR) (4, 8, 305, 310). Indeed, GPCR signalling has been associated with cell migration (360, 361). Hence, the possibility existed that the cellular effects mediated by topo were GPCR-dependent. Therefore, the susceptibility of topo-mediated cellular effects to pertussis toxin (PTX) was tested. PTX has been widely used as a reagent to characterize the involvement of heterotrimeric G-proteins in signalling (362), as PTX uncouples $\text{G}\alpha_i$ proteins from transmembrane receptors. The stimulation of cell migration by topo was tested in the presence of PTX. Cells were incubated with PTX in 0.5% FBS-supplemented media for 16 hours prior to being stimulated with topo for 6 hours. As shown in Figure 3A, stimulation by topo was abolished by the PTX treatment. Migration of vehicle-stimulated cells was not affected by PTX. The topo-mediated activation of

intracellular signalling pathways was also investigated following PTX treatment (Figure 3B). Cells were incubated with PTX for 16 hours prior to topo stimulation. PTX treatment inhibited the topo-dependent activation of intracellular pathways: activation of PLC γ 1 and c-Raf by topo was completely inhibited while phosphorylation of ERK1/2 and p38 after 10 minutes of topo stimulation were strongly reduced (Figure 3B). Taken together, these results suggest that the effects of topo on NHDF migration and signalling were mediated by a G α_i protein-coupled receptor.

CCL21 interferes with topo binding on fibroblast surfaces. Autoantigens have been demonstrated to bind to chemokine receptors of the G α_i PCR subfamily (4, 8, 305, 310). A possible candidate for a chemokine receptor for topo was CCR7 since its involvement in fibrotic diseases, via one of its ligand, CCL21, has been described (346, 348, 351, 352). Therefore, investigation of a potential competition of CCL21 with topo for binding on fibroblast surfaces was performed. To directly detect topo binding on cell surfaces, we coupled topo with the fluorochrome PE and its binding was assessed by flow cytometry. Bovine serum albumin coupled to PE was used as a negative protein control. As expected and shown in Figure 4A, topo-PE detection revealed high binding on fibroblast surfaces while BSA-PE revealed no binding. To compete with topo-PE binding, different concentrations of CCL21 were simultaneously added with topo-PE on cells. As shown in Figure 4B, the interaction between topo-PE and fibroblast surfaces significantly decreased as the concentration of CCL21 increased suggesting a dose-dependent competition for fibroblast surfaces. However, the inhibition of topo-PE binding is incomplete. CCL21 binds no other GPCR than CCR7 but another ligand for CCR7 is CCL19, albeit with distinct signalling properties (349, 363, 364). Therefore, we tested whether CCL19 could also compete for topo-PE binding on fibroblast surfaces. CCL19 did not significantly affect topo-PE binding (Figure 4B). These data strongly support the hypothesis that topo binds to the CCL21 receptor, presumably CCR7, in a manner more resembling that of CCL21 than that of CCL19.

Expression of CCR7 protein on dermal fibroblasts. CCR7 is expressed by lymphocytes and dendritic cells and plays a central role in lymphocyte trafficking and homing to lymph nodes (365). However, expression of CCR7 by other cell types has also been demonstrated (345-348). The expression of CCR7 in normal fibroblasts being a matter of controversy (347), immunoblotting was first performed with an anti-CCR7 monoclonal antibody on NHDF lysates. As seen in Figure 5A, a single band at 45 kDa, which corresponds to the expected size of the coding sequence for CCR7, was observed. No band was observed in the absence of the primary antibody (Figure 5A; lane 1). As CCR7 protein expression by NHDF was confirmed, its surface expression needed to be established. Hence, flow cytometry analysis of CCR7 was performed on intact cells. Results show a high percentage of anti-CCR7 monoclonal antibody-labelled cells (Figure 5B; unfilled area) compared to cells labelled with the isotype control (Figure 5B; filled area). Taken together, our data confirm the presence of CCR7 at the surface of NHDF.

Topo interacts with the chemokine receptor 7. Since CCL21 interferes with topo-PE binding on fibroblast surfaces (Figure 4B) and CCR7 is present on fibroblast surfaces, an interaction between CCR7 and topo became relevant to investigate. Even more so since CCR7 has been shown to regulate cell migration under CCL21 stimulation in a PTX-sensitive manner (366, 367) via phosphorylation of PLC γ 1 and ERK1/2 (367). To confirm a direct interaction between topo and CCR7, an *in vitro* protein-based ELISA was performed with recombinant CCR7-GST. Topo was immobilized on the microplate and varying concentrations of CCR7-GST protein were added. As shown in Figure 6A, CCR7-GST, detected with a horseradish peroxidase-conjugated anti-GST, bound to topo in a dose-dependent manner. Similar results were obtained when CCR7-GST was detected with a rabbit monoclonal anti-CCR7 antibody (data not shown). GST protein alone was used as a negative control and displayed no binding to topo (data not shown).

Since CCL21 has been shown to interfere with topo-PE binding on fibroblast surfaces (Figure 4B), competition between CCL21 and topo for CCR7 binding was assayed by ELISA. Constant amounts of CCR7-GST were incubated with increasing concentrations of CCL21 before being added to immobilized topo. The binding of CCR7 was detected as above. As shown in Figure 6B, the interaction between topo and CCR7 was significantly decreased as the concentration of CCL21 increased. This result suggests that CCL21 competes with topo for CCR7 binding. This finding is consistent with the CCL21 competition for topo-PE binding to cell surfaces shown by flow cytometry analysis (Figure 4B). CCL19 has also been tested as a competitor and displayed no significant competition (data not shown). Taken together, these results strongly suggest that topo interacts with CCR7 on fibroblast surfaces, which could then mediate the biological effects of topo.

DISCUSSION

A number of autoantigens were recently described as bifunctional molecules since they display a second extracellular role when they are released in the extracellular environment following cell death (4, 8, 13, 261, 310). Indeed, extracellular autoantigens have been suggested to participate in normal wound repair processes by acting like cytokines or chemokines and moreover, these new roles can contribute to the development of autoimmune diseases (8, 10). Results in the present study suggest that topo displays an extracellular role on fibroblasts and can thus be added to this set of bifunctional molecules, in ways similar to the CENP-B autoantigen, another autoantigen targeted in SSc (9).

Normal wound healing implicates the migration of fibroblasts into the wounded bed to, among other functions, synthesize new extracellular matrix. Our results demonstrated that topo positively stimulated fibroblast migration in an *in vitro* wound healing assay. This result suggests that, *in vivo*, topo released from injured endothelial cells could bind to bystander fibroblasts (13) and stimulate the normal wound healing process. Topo has been demonstrated to display chemoattractant activity also towards immature dendritic cells and human monocytes (10). The stimulation of fibroblast migration by topo was accompanied by activation of intracellular signalling pathways. Activation of PLC γ 1, c-Raf, ERK1/2 and p38 MAPK was observed under topo stimulation. Activation of these intracellular signalling pathways may then be involved in the migratory ability of fibroblasts upon topo stimulation. Indeed, these intracellular signalling proteins have been involved in migratory process (360, 361, 367). Taken together, these results represent the first demonstration that topo displays a novel extracellular role that can affect fibroblast physiology.

Bifunctional autoantigens act via chemokine receptors, a subfamily of the GPCR family receptors (4, 8, 304, 305). Here, a G α_i PCR appears to be involved in mediating the cellular effects of topo since topo stimulation of fibroblast migration was inhibited by treatment with PTX, which uncouples G α_i proteins from transmembrane receptors and thus

block their inhibitory functions. Moreover, activation of the intracellular signalling pathways under topo stimulation was also abolished or significantly reduced by PTX treatment.

Although CCR7 expression on normal dermal fibroblasts is a subject of controversy (347), CCR7 expression on NHDF surfaces has been herein confirmed by immunoblotting and flow cytometry analysis. Furthermore, high amounts of CCR7 were detected by flow cytometry on NHDF surfaces.

It has been demonstrated by others that CCR7 and one of its ligand CCL21 are involved in many fibrotic diseases (16, 18, 21, 22). Using topo coupled to the PE fluorochrome, we demonstrated that CCL21 interferes with topo binding to fibroblast surfaces. CCL21 affects topo-PE binding in a dose-dependent manner while CCL19, the other ligand for CCR7, did not affect topo-PE binding to fibroblast surfaces. This result could be explained by the different cellular effects observed following CCR7 activation by both ligands (349, 363, 364). However, the competition with CCL21 was incomplete suggesting another membrane partner for topo binding. We are currently working on the identification of another partner for topo binding on fibroblast surfaces.

Since CCL21 is the ligand of no other signalling GPCR (343), CCR7 is strongly favoured as the corresponding target for topo. A direct interaction between topo and CCR7 demonstrated a dose-dependent binding in a protein-based ELISA. CCL21 was here again used to compete this interaction and demonstrated a dose-dependent inhibition of the interaction of topo with CCR7. This result is furthermore suggestive that topo binds to CCR7 and that CCL21 interferes with this cell-specific interaction both in an *in vitro* and *in vivo* assay.

Taken together, these results are consistent with the concept that autoantigens serve to alert the immune system to danger signals from damaged tissues to facilitate repair (10). In the context of SSc pathophysiology, binding of topo/anti-topo immune complexes to fibroblast leads to the adhesion and activation of monocyte cells (13). These cells could

further lead to the initiation and maintenance of an inflammatory cascade stimulating the fibrosis characteristic of SSc-associated with anti-topo. Hence, our the results of this study suggest that anti-topo autoantibodies present in the sera of SSc patients could exert their pathophysiological effects by interfering with the normal role of topo as a danger signal to fibroblasts (22).

Acknowledgments

We wish to thank Ms Isabelle Clément for expert technical assistance.

REFERENCES

1. Howard OM, Dong HF, Su SB, Caspi RR, Chen X, Plotz P, et al. Autoantigens signal through chemokine receptors: uveitis antigens induce CXCR3- and CXCR5-expressing lymphocytes and immature dendritic cells to migrate. *Blood*. 2005;105(11):4207-14.
2. Robitaille G, Henault J, Christin MS, Senecal JL, Raymond Y. The nuclear autoantigen CENP-B displays cytokine-like activities toward vascular smooth muscle cells. *Arthritis Rheum*. 2007;56(11):3814-26.
3. Oppenheim JJ, Dong HF, Plotz P, Caspi RR, Dykstra M, Pierce S, et al. Autoantigens act as tissue-specific chemoattractants. *J Leukoc Biol*. 2005;77(6):854-61.
4. Howard OM, Dong HF, Yang D, Raben N, Nagaraju K, Rosen A, et al. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J Exp Med*. 2002;196(6):781-91.
5. Mitola S, Belleri M, Urbinati C, Coltrini D, Sparatore B, Pedrazzi M, et al. Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J Immunol*. 2006;176(1):12-5.
6. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol*. 2005;78(1):1-8.
7. Howard OZ. Autoantigen signalling through chemokine receptors. *Curr Opin Rheumatol*. 2006;18(6):642-6.
8. Robitaille G, Christin MS, Clement I, Senecal JL, Raymond Y. Nuclear autoantigen CENP-B transactivation of the epidermal growth factor receptor via chemokine receptor 3 in vascular smooth muscle cells. *Arthritis Rheum*. 2009;60(9):2805-16.
9. Scussel-Lonzetti L, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Rich E, Goulet JR, et al. Predicting mortality in systemic sclerosis: analysis of a cohort of 309 French Canadian

patients with emphasis on features at diagnosis as predictive factors for survival. *Medicine* (Baltimore). 2002;81(2):154-67.

10. Henault J, Robitaille G, Senecal JL, Raymond Y. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum*. 2006;54(3):963-73.

11. Nihtyanova SI, Denton CP. Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(2):112-6.

12. Forster R, Davalos-Missslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):362-71.

13. Sanchez-Sanchez N, Riol-Blanco L, Rodriguez-Fernandez JL. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol*. 2006;176(9):5153-9.

14. Banas B, Wornle M, Berger T, Nelson PJ, Cohen CD, Kretzler M, et al. Roles of SLC/CCL21 and CCR7 in human kidney for mesangial proliferation, migration, apoptosis, and tissue homeostasis. *J Immunol*. 2002;168(9):4301-7.

15. Sakai N, Wada T, Yokoyama H, Lipp M, Ueha S, Matsushima K, et al. Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(38):14098-103.

16. Bruhl H, Mack M, Niedermeier M, Lochbaum D, Scholmerich J, Straub RH. Functional expression of the chemokine receptor CCR7 on fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology* (Oxford). 2008;47(12):1771-4.

17. Pierce EM, Carpenter K, Jakubzick C, Kunkel SL, Evanoff H, Flaherty KR, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts migrate and proliferate to CC chemokine ligand 21. *Eur Respir J*. 2007;29(6):1082-93.

18. Kohout TA, Nicholas SL, Perry SJ, Reinhart G, Junger S, Struthers RS. Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *J Biol Chem*. 2004;279(22):23214-22.

19. Otero C, Groettrup M, Legler DF. Opposite fate of endocytosed CCR7 and its ligands: recycling versus degradation. *J Immunol.* 2006;177(4):2314-23.
20. Bonacchi A, Petrai I, Defranco RM, Lazzeri E, Annunziato F, Efsen E, et al. The chemokine CCL21 modulates lymphocyte recruitment and fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2003;125(4):1060-76.
21. Pierce EM, Carpenter K, Jakubzick C, Kunkel SL, Flaherty KR, Martinez FJ, et al. Therapeutic targeting of CC ligand 21 or CC chemokine receptor 7 abrogates pulmonary fibrosis induced by the adoptive transfer of human pulmonary fibroblasts to immunodeficient mice. *Am J Pathol.* 2007;170(4):1152-64.
22. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999;341(10):738-46.
23. Li W, Fan J, Chen M, Guan S, Sawcer D, Bokoch GM, et al. Mechanism of human dermal fibroblast migration driven by type I collagen and platelet-derived growth factor-BB. *Mol Biol Cell.* 2004;15(1):294-309.
24. Huang C, Jacobson K, Schaller MD. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 20):4619-28.
25. Pullikuth AK, Catling AD. Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: a perspective. *Cell Signal.* 2007;19(8):1621-32.
26. Diaz B, Barnard D, Filson A, MacDonald S, King A, Marshall M. Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling. *Mol Cell Biol.* 1997;17(8):4509-16.
27. Tvorogov D, Wang XJ, Zent R, Carpenter G. Integrin-dependent PLC-gamma1 phosphorylation mediates fibronectin-dependent adhesion. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 3):601-10.
28. Buckley CT, Sekiya F, Kim YJ, Rhee SG, Caldwell KK. Identification of phospholipase C-gamma1 as a mitogen-activated protein kinase substrate. *J Biol Chem.* 2004;279(40):41807-14.

29. Redondo-Munoz J, Jose Terol M, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A. Matrix metalloproteinase-9 is up-regulated by CCL21/CCR7 interaction via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling and is involved in CCL21-driven B-cell chronic lymphocytic leukemia cell invasion and migration. *Blood*. 2008;111(1):383-6.
30. Huang CY, Lee CY, Chen MY, Yang WH, Chen YH, Chang CH, et al. Stromal cell-derived factor-1/CXCR4 enhanced motility of human osteosarcoma cells involves MEK1/2, ERK and NF-kappaB-dependent pathways. *J Cell Physiol*. 2009;221(1):204-12.
31. Fields TA, Casey PJ. Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J*. 1997;321 (Pt 3):561-71.
32. Bardi G, Lipp M, Baggiolini M, Loetscher P. The T cell chemokine receptor CCR7 is internalized on stimulation with ELC, but not with SLC. *Eur J Immunol*. 2001;31(11):3291-7.
33. Otero C, Eisele PS, Schaeuble K, Groettrup M, Legler DF. Distinct motifs in the chemokine receptor CCR7 regulate signal transduction, receptor trafficking and chemotaxis. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 16):2759-67.
34. Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Shibuta K, et al. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res*. 2002;62(10):2937-41.
35. Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(1):258-63.
36. Shannon LA, Calloway PA, Welch TP, Vines CM. CCR7/CCL21 migration on fibronectin is mediated by phospholipase Cgamma1 and ERK1/2 in primary T lymphocytes. *J Biol Chem*. 2010;285(50):38781-7.
37. Henault J, Tremblay M, Clement I, Raymond Y, Senecal JL. Direct binding of anti-DNA topoisomerase I autoantibodies to the cell surface of fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(10):3265-74.

38. Tveita AA. The danger model in deciphering autoimmunity. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(4):632-9.

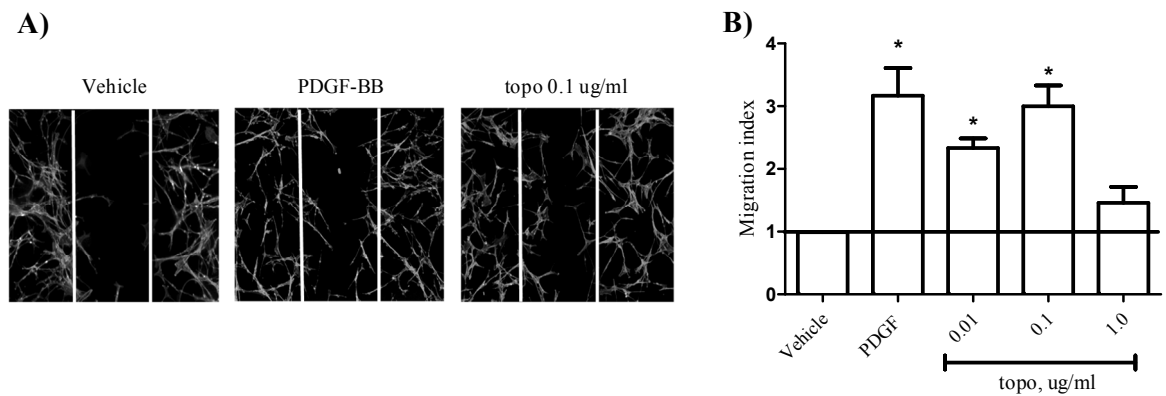


Figure 1. Topo stimulated the repair of a fibroblast wounded monolayer. **A)** Scraped monolayers of NHDF were incubated with topo. After 6 hours of incubation, cells were fixed, permeabilized and double-stained with phalloidin and Hoechst 33258. **B)** Nuclei of NHDF that had migrated into wound were counted. The horizontal line corresponds to the number of cells migrating in the absence of any stimulation. Platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB; 10 ng/ml) was used as a positive control. Results are expressed as the mean and SEM of 4 fields per coverslip, and are representative of 3 independent experiments. * = $P < 0.005$ versus vehicle.

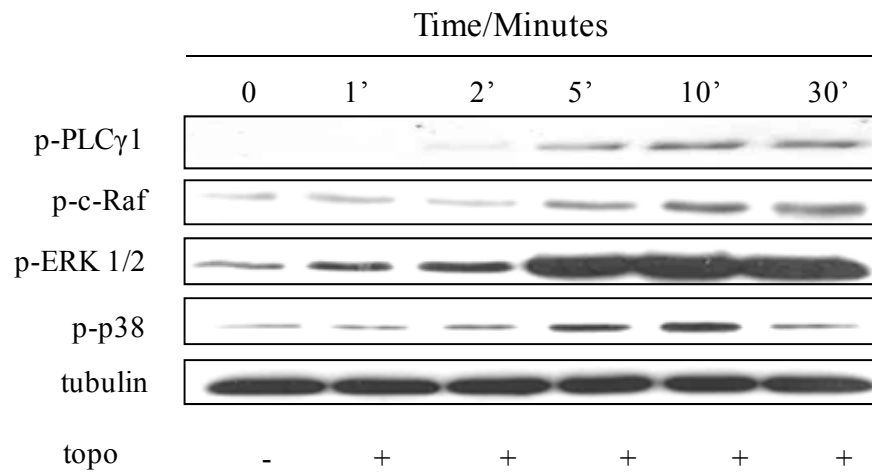


Figure 2. Topo induces PLC γ 1, c-Raf, ERK-1/2 and p38 phosphorylation. NHDF were grown in serum-free media for 48 hours and then incubated with topo (10 ng/ml) for the indicated times. Whole cell lysates were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotted with specific phospho-antibodies as indicated. An anti- β -tubulin 1 antibody was used as a control for sample loading. Results are representative of 3 different experiments.

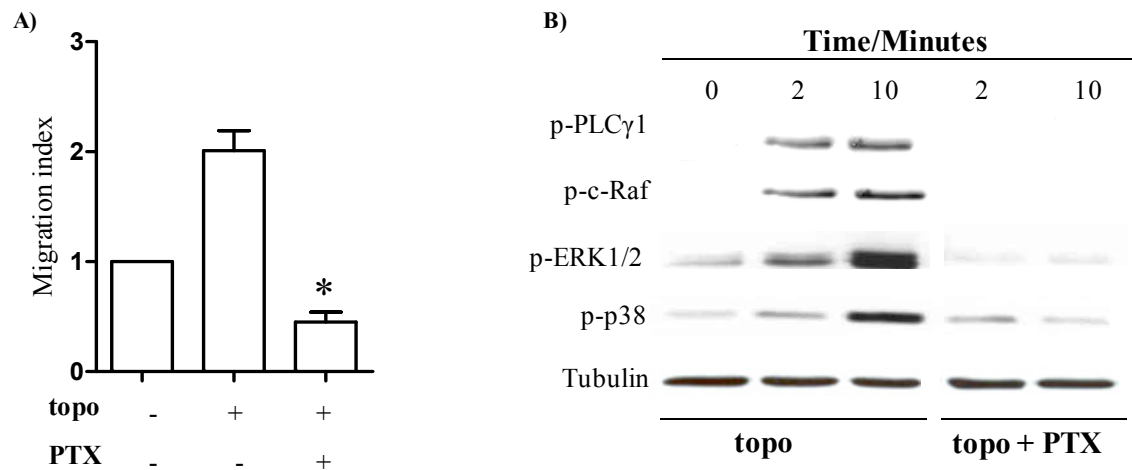


Figure 3. Topo-mediated effects on fibroblasts involve a $G\alpha_i$ protein-coupled receptor. **A)** NHDF were treated with pertussis toxin (PTX; 100 ng/ml) for 16 hours before the wound healing assay. Topo (100 ng/ml) was added to the scraped monolayer for 6 hours and cell migration was evaluated. * = $P < 0.005$ versus untreated cells. Results are expressed as the mean and SEM of 4 fields per coverslip in duplicate and are representative of 3 different experiments. **B)** NHDF were incubated in the presence or absence of PTX (100 ng/ml) for 16 hours prior to stimulation with topo (10 ng/ml) for the indicated times. Whole cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated phospho-specific antibodies. Tubulin antibody detection was used to ascertain uniformity of protein loading. Results shown are representative of 3 independent experiments.

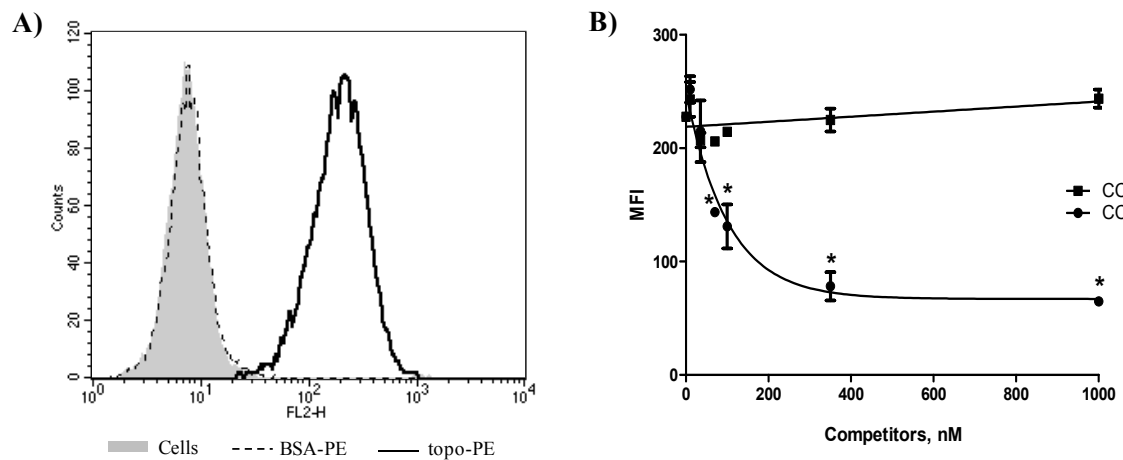


Figure 4. CCL21 interferes with topo-PE binding on fibroblast surfaces. Flow cytometry analysis are shown. **A)** Topo coupled to fluorochrome PE (topo-PE) binds to fibroblast surfaces while bovine albumin serum (BSA)-PE, used as a control coupling protein, shows no binding on fibroblast surfaces. **B)** Constant amount of topo-PE and different concentrations of CCL21 or CCL19 were simultaneously added to cells. As concentration of CCL21 increased, topo-PE binding to fibroblast surfaces decreased while CCL19 had no effect on topo-PE binding * = $P < 0.05$. These results are representative of 3 different experiments.

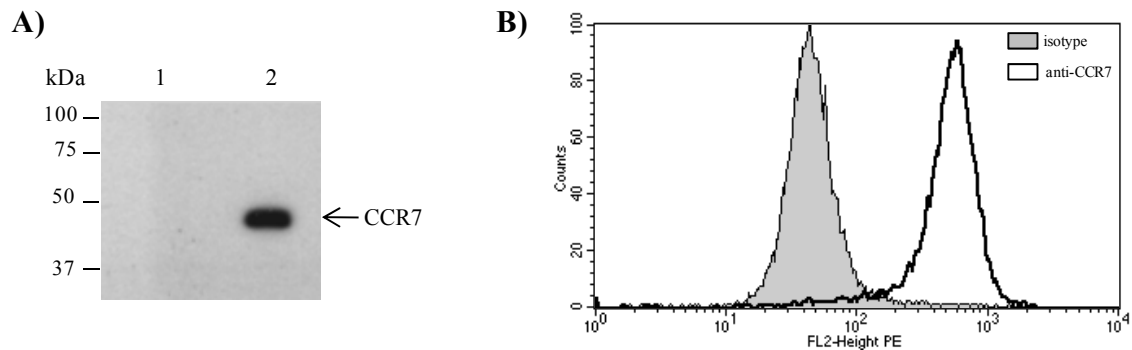


Figure 5. Detection of CCR7 expression in NHDF. **A)** Determination of CCR7 protein expression by immunoblotting. Whole cell lysates were sonicated and clarified by centrifugation. The soluble fractions were resolved on 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis gels and immunoblotted with a rabbit monoclonal antibody to CCR7 (lane 2). Horseradish peroxidase–conjugated secondary antibody was used as negative control (lane 1). **B)** Determination of CCR7 surface expression by flow cytometry analysis. Cells were labeled with an anti-CCR7 monoclonal antibody (unfilled area) or with an isotype control (filled area) and antibody binding was revealed with PE-conjugated secondary antibody. Results shown are representative of 3 independent experiments.

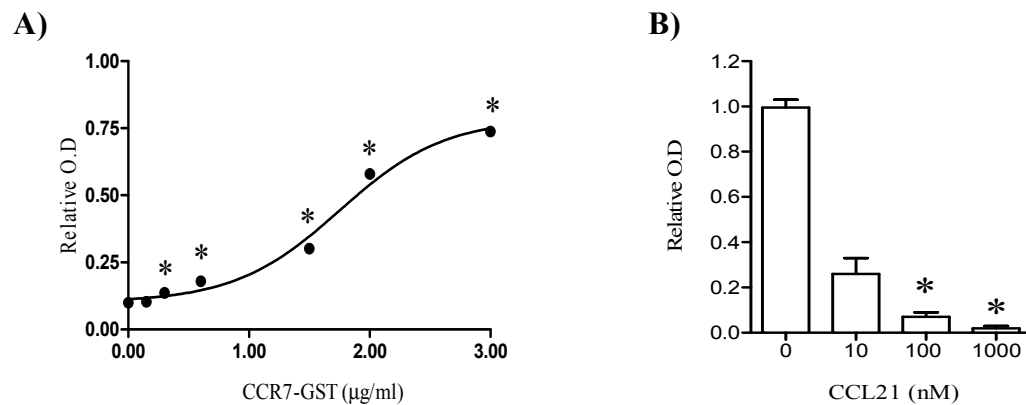


Figure 6. Topo interacts with chemokine receptor 7. **A)** Quantification of CCR7-GST binding to topo by protein-based enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Topo was immobilized by direct adsorption to the microplate surface and incubated with increasing concentrations of CCR7-GST protein for 1 hour at 37°C. CCR7-GST binding was detected with horse radish peroxidase-conjugated anti-GST. * = $P < 0.0005$ versus untreated wells. **B)** Competitive assay between CCL21 and topo for CCR7 binding by ELISA. CCR7-GST protein (1.5 μg/ml) was preincubated with increasing concentrations of CCL21 for 30 minutes prior to incubation with immobilized-topo. CCR7 binding was detected as described above. * = $P < 0.005$ versus untreated wells. Data are presented as the relative OD from pooled triplicates and are representative of 3 independent experiments.

Article no. 2 : Les auto-anticorps anti-ADN topoisomérase I (topo) amplifient la liaison de la topo au niveau des chaînes d'héparanes sulfates à la surface des fibroblastes dermiques.

Article prêt pour une soumission dans : *Arthritis & Rheumatism*

Présentation de l'article no. 2

La présence de complexes immuns est associée à plusieurs maladies auto-immunes et contribue au développement de dommages tissulaires et d'inflammation (277, 368-370). Il a été démontré que l'auto-antigène topo se liait de façon spécifique à la surface des fibroblastes ce qui entraînait le recrutement d'anti-topo ainsi que l'adhésion et l'activation de cellules monocytaires (13). Il a donc été suggéré que le complexe immunitaire topo/anti-topo lié à la surface du fibroblaste contribue au développement d'un contexte inflammatoire propice au développement de la fibrose, caractéristique de la ScS. Ainsi, le but de la présente étude était de caractériser l'interaction moléculaire du complexe immunitaire topo/anti-topo avec le fibroblaste pour ensuite déterminer son rôle potentiel dans la pathogenèse de la ScS.

Nous avons démontré que la présence d'anti-topo amplifiait la liaison de la topo à la surface des fibroblastes par l'entremise des protéoglycans à chaînes d'héparanes sulfates (HSPG) présents à la surface des fibroblastes.

La contribution pathogène des anti-topo étant associée à leur recrutement à la surface des fibroblastes, cibler l'interaction du complexe immunitaire avec les fibroblastes s'avérerait une approche thérapeutique intéressante. Nous avons démontré que l'utilisation d'héparine non-fractionnée (HNF) ainsi que des héparines de bas poids moléculaires (HBPM) prévenait la liaison du complexe immunitaire et que leur présence permettait même de dissocier le complexe immunitaire lié à la surface du fibroblaste.

Ces résultats suggèrent pour la première fois que l'accumulation du complexe immunitaire topo/anti-topo au niveau des HSPG à la surface des fibroblastes pourrait contribuer à la pathogenèse de la ScS. De plus, il a été démontré que l'HNF et les HBPM peuvent perturber cette amplification de liaison ce qui ouvre la voie à l'étude de futures approches thérapeutiques.

Contribution des auteurs à l'article no. 2 :

- J.A. : Élaboration du protocole expérimental; collecte et analyse scientifique et statistiques des résultats expérimentaux; rédaction de l'article.
- G.R. : Élaboration du protocole expérimental; collecte et analyse scientifique et statistiques des résultats expérimentaux; rédaction de l'article.
- M.K. : Élaboration du protocole expérimental.
- J.-L.S. : Élaboration du protocole expérimental ; analyse scientifique des résultats; rédaction de l'article.
- Y.R. : Élaboration du protocole expérimental; analyse scientifique des résultats; rédaction de l'article.

**ARTICLE NO. 2 : ANTI-DNA TOPOISOMERASE I (TOPO) AUTOANTIBODIES
FROM SYSTEMIC SCLEROSIS PATIENTS AMPLIFY TOPO
BINDING TO HEPARAN SULFATE CHAINS OF DERMAL
FIBROBLASTS**

**Authors: Julie Arcand, Geneviève Robitaille, Martial Koenig, Jean-Luc
Senécal and Yves Raymond**

Julie Arcand, BSc, PhD candidate, Geneviève Robitaille, PhD, Martial Koenig, MD, Assistant Professor of Medicine, Jean-Luc Senécal, MD, FRCPC, FACP, Professor of Medicine, Yves Raymond, PhD, Professor of Medicine

Laboratory for Research in Autoimmunity, Notre-Dame Hospital, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; and Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Supported by grants MOP-68966 and MOP-81252 (JLS, YR) from the Canadian Institutes of Health Research, by grants from Sclérodémie Québec (JLS, YR, MK), and by studentships (JA) from Sclérodémie Québec and Université de Montréal

Running head: anti-topo autoantibodies amplify topo binding to fibroblasts

Address correspondence and reprint requests to:

Yves Raymond, PhD

Laboratory for Research in Autoimmunity

Notre-Dame Hospital, CHUM

1560 Sherbrooke East

Montreal QC H2L 4M1

Canada

Phone: 514-890-8000 ext. 25481

Objective: Previous studies have demonstrated that the systemic sclerosis (SSc)-associated autoantigen DNA topoisomerase I (topo) bound specifically to the surface of fibroblasts when released in the extracellular environment and recruited anti-topo antibodies, which subsequently led to the adhesion and activation of monocytes. This study aimed to characterize the molecular interactions between topo and fibroblast surfaces in order to elucidate the pathogenic role of topo/anti-topo immune complexes in SSc.

Methods: Topo coupled to PE and Cy3 fluorochromes were used to follow its binding to normal human dermal fibroblast surfaces by flow cytometry and fluorescence microscopy, respectively. Purified IgG from normal subjects or from SSc patients were added simultaneously with topo on cells. Unfractionated and low molecular weight heparins were used to determine their effects on the binding of topo and topo/anti-topo immune complexes to fibroblast surfaces.

Results: Heparan sulfate proteoglycans on fibroblast surfaces were found to act as coreceptors for topo binding. The addition of anti-topo autoantibodies from SSc sera led to the amplification of topo binding to heparan sulphate chains. Unfractionated and low molecular weight heparins were shown to inhibit topo and topo/anti-topo immune complexes binding to heparan sulphate chains.

Conclusion: This is the first report showing that anti-topo antibodies amplify topo binding to fibroblast surfaces via the interaction with heparan sulphate chains. The accumulation of topo on cell surfaces by anti-topo antibodies could contribute, via stimulated monocyte adhesion and activation, to the initiation of an inflammatory cascade stimulating the fibrosis characteristic of SSc associated with anti-topo. Unfractionated and low molecular weight heparins inhibited the binding of topo/anti-topo immune complexes to fibroblasts and, thus, could become useful therapeutic approaches to perturb the early development of SSc-associated fibrosis.

Immune complex (IC) deposition is a prominent feature of several autoimmune diseases, including systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren syndrome and rheumatoid arthritis (1-3) and is considered to mediate tissue injury and inflammation (4). Moreover, inhibition of IC binding to target cells has been shown to provide benefits in both *in vitro* and *in vivo* autoimmune models (6-8).

Anti-topo autoantibodies are one of the major autoantibodies found in systemic sclerosis (SSc), an autoimmune disease characterized by inflammation, blood vessel damage and progressive interstitial and perivascular fibrosis. They are present in 20-30% of SSc patients and are associated with the diffuse form of the disease characterized by extensive cutaneous and lung fibrosis, and high mortality (9, 10). Although anti-topo titers correlate with SSc activity and severity, their implication in the pathophysiology of SSc is still unclear. However, there is now growing evidence that they are not just silent markers of the disease (5, 11-17).

A number of nuclear autoantigens, released from apoptotic or necrotic cells, have been found to bind to cell surfaces where they are targeted by autoantibodies (5, 13, 18). One of these autoantigens is the nuclear enzyme, topo, targeted in the diffuse form of the SSc. Previous reports have demonstrated that topo binds specifically to the surface of fibroblasts, which are key cells in fibrotic development, and recruits anti-topo autoantibodies from SSc patients, thus forming immune complexes on fibroblast surfaces. These fibroblasts were shown to induce adhesion and activation of monocytes (5). Thus, topo/anti-topo IC on fibroblast surfaces could contribute to the initiation of an inflammatory cascade.

To better understand this putative pathogenic contribution of topo/anti-topo IC to SSc, characterization of the molecular interactions between topo and fibroblast surfaces is essential. Proteoglycans (PG) are abundant molecules on the cell surfaces of numerous cells. They represent low affinity but high capacity receptors that facilitate the presentation of a ligand to its high affinity receptor (19), thus acting as coreceptors. They are composed

of disaccharide repetitions with various sulphated regions and exhibit great molecular diversity (20, 21) which confers to them cell and tissue-specificity (22, 23). The PG that most frequently act as coreceptors for a number of ligands are the heparan sulphate PG (HSPG) family (20).

The aims of the present study were to identify the target responsible for the specific binding of topo to fibroblast surfaces, and to investigate a putative pathogenic role for topo/anti-topo IC in SSc. Results presented here show evidence that topo binds specifically to HSPG on fibroblast surfaces and, moreover, that anti-topo autoantibodies from SSc sera amplify topo binding to HS chains. Overall, these findings support a scenario whereby topo/anti-topo IC contributes to the fibrotic cascade in SSc patients.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and reagents. Normal human dermal fibroblasts (NHDF) from adults and their culture media were from Lonza (Walkersville, MD). NHDF were cultured in fibroblast basal medium supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS), 5 µg/ml of bovine insulin, 1 ng/ml of human fibroblast growth factor B, 50 µg/ml of gentamicin sulfate and 100 µg/ml penicillin-streptomycin (Wisent Inc., St-Bruno, Canada). Cells were used at passage 5. Cells were grown at 37°C in air with 5% CO₂. Subculturing was achieved before confluence, using trypsin and trypsin-neutralizing solution (Lonza). DNA topoisomerase I (topo) was obtained from Immunovision (Springdale, AR). In this report, all the experiments were done using topo purified from rabbit thymus. Recombinant human topo produced using the baculovirus/insect cell expression system and obtained from Diarect (Freiburg, Germany) was also tested in many experiments with similar results. Each topo preparation was tested for the presence of endotoxin and analyzed for purity upon receipt by gel electrophoresis and immunoblotting. Mouse monoclonal antibody against topo was purchased from USBiological (Massachusetts, MA). Heparitinase (Hep) and monoclonal anti-heparan sulphate (HS) chain antibody (F58-10E4) were obtained from Seikagaku corporation (Tokyo, Japan). Anti-CD51 antibody (P2W7) was obtained from R&D systems (Minneapolis, MN). Unfractionated heparin (UFH) was purchased from Sigma (Oakville, Ontario, Canada). Low molecular weight heparins (LMWH): dalteparin (Fragmin; Pfizer Canada), enoxaparin (Lovenox; Sanofi Aventis) and fondaparinux (Arixtra; Glaxosmithkline) were purchased directly from Notre-Dame Hospital's pharmacy (Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada).

Antibody purification. Human IgG were purified as described (13). Briefly, total IgG was purified from sera by affinity chromatography using the Nab Protein G Spin Chromatography Kit (Pierce, Rockford, IL) following manufacturer's instructions. Final

IgG concentrations were determined with the Bradford dye-binding procedure. Anti-topo IgG was depleted as previously described (13) with minor changes. Briefly, individual whole IgG preparation from anti-topo positive SSc patient sera were incubated for several passages on nitrocellulose membranes with adsorbed topo. Anti-topo IgG depletion was confirmed by immunoblotting on purified topo after sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). SSc patients were selected from a French-Canadian cohort with SSc diagnosed at the Connective Tissue Diseases and Vascular Medicine Clinics of Notre-Dame Hospital, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. All patients fulfilled the American College of Rheumatology (formerly, the American Rheumatism Association) preliminary criteria for the classification of SSc (9, 24). Sera were collected as previously described (5).

Flow cytometry. Topo or bovine serum albumin (BSA) was coupled to the fluorochrome PE using the Lightning-Link PE Conjugation Kit from Innova Biosciences (Babraham, Cambridge, UK) according to manufacturer's instructions. Cells were grown until confluence, detached with phosphate buffered saline (PBS)/2% trypsin and washed once with PBS. Topo binding was assessed by incubating cells with topo-PE (1.0 µg/ml) for 30 minutes at 25°C in PBS/3% BSA, cells were washed with PBS and fixed with 1% paraformaldehyde (PFA) for 5 minutes at 4°C. As needed, total IgG purified from normal subjects and SSc patients (100 µg/ml) or anti-topo depleted IgG (100 µg/ml) were added to the cells simultaneously with topo-PE. Where required, cells were preincubated with heparitinase (Hep; 0.05 U/ml) for 1 hour at 37°C and the presence of HS chains on the cell surface was detected with an anti-heparan sulfate antibody (1/100). As needed, NHDF were incubated with either UFH or LMWH at the indicated concentrations simultaneously with topo alone or topo/anti-topo autoantibodies for the competition assays or after 30 minutes for the dissociation assays. Cell permeability was assessed in the presence of 7-aminoactinomycin D (Sigma), and permeable cells were gated out. Fluorescence was

detected on a FACScan and analyzed by CellQuest software (BD Biosciences, San Jose, CA).

Immunofluorescence assays. Topo or BSA were coupled to the fluorochrome Cy3 using the Lightning-Link Cy3 Conjugation Kit from Innova Biosciences according to manufacturer's instructions. Cells were grown to confluence on glass coverslips in a 12-well plate and incubated with topo-Cy3 (1.0 µg/ml) for 30 minutes at 37°C in complete medium, cells were washed once with PBS and fixed with 1% PFA for 5 minutes at 4°C. Where required cells were pretreated with Hep (0.05 U/ml; 1 hour) and/or incubated with total IgG (100 µg/ml) purified from normal subjects and SSc patients or anti-topo depleted IgG for 30 minutes at 37°C. As needed, NHDF were incubated with either the UFH or LMWH at 10 µg/ml. Nuclei were stained with Hoechst 33258 diluted in PBS-3% BSA. Cells were examined at a magnification of 40X with an Eclipse E600 fluorescence microscope (Nikon, Melville, NY) using NIS-elements 3.0 Ar software (Nikon, Melville, NY) with a photometrics HQ² coolSNAP camera (Tucson, AZ).

Topo ELISA. The 96 well microtiter Immulon IIB plates were coated with topo at 350 ng/well in coating buffer (15 mM Na₂CO₃ + 35 mM NaHCO₃, pH 9.6) for 1 hour at 37°C. After extensive washes with PBS-0,5% Tween-20, wells were blocked with blocking buffer (PBS-foetal bovin serum 2%-BSA1%-0,5% Tween-20) for 2 hours at 37°C. IgG purified from SSc patients and normal controls were added (10 µg/ml) in blocking buffer for 1 hour at 37°C and antibody binding was revealed with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and *o*-phenylenediamine/citrate substrate solution. The optical density (OD) at 490 nm was read in an MRX Revelation Microplate Reader (Dynex, Chantilly, VA). Samples were tested in triplicate.

Statistical analysis. Student's unpaired 2-tailed *t*-test was used for all statistical analysis. Statistical tests were performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA). P-values less than 0.05 were considered significant. To investigate the association between OD and mean fluorescence intensity (MFI), we computed a Pearson correlation coefficient and estimated an univariate linear model. We used robust sandwich estimators of the covariance matrix to produce valid p-values (25, 26).

RESULTS

Anti-topo autoantibodies from systemic sclerosis (SSc) patients amplify topo binding to normal human dermal fibroblast (NHDF) surfaces. Previous work has demonstrated that the binding of topo/anti-topo IC on the surface of fibroblasts contribute to the initiation of an inflammatory cascade (5). Analysis to characterize the interaction of topo and anti-topo autoantibodies with NHDF surfaces was undertaken in order to elucidate the putative pathogenic role of topo/anti-topo IC in SSc.

The ability of fluorescently conjugated-topo (topo-PE) to bind to fibroblast surfaces was first evaluated and compared with that of topo-PE after incubation with anti-topo antibodies, presumably in the form of IC. NHDF were incubated with topo-PE, either alone or simultaneously with whole IgG purified from anti-topo positive SSc sera or with IgG purified from normal sera and examined for fluorescence emitted from PE by flow cytometry. As shown in Figure. 1A, topo-PE (dotted lines) strongly stained fibroblasts, as compared with BSA-PE staining (shaded area), used as a negative PE-labeled protein control. Topo-PE binding to NHDF increased when anti-topo autoantibodies from SSc patients were present (Figure 1A; right panel). In contrast, IgG purified from normal sera had no effect on topo binding (Figure 1A; left panel). As shown in Figure. 1B, the amplifying effects of anti-topo autoantibodies on topo binding was detectable as early as 5 minutes after adding the reagents to the NHDF and slowly reached a maximum after 1-2 hours of incubation. No amplifying activity was observed when normal IgG were used even after 2 hours of incubation. Similar results were obtained with IgG purified from all 19 anti-topo-positive SSc sera tested (Figure 1C). None of the IgG from normal sera (n = 5), anti-TH-positive SSc sera (n = 3), or anti-centromere (ACA)-positive SSc sera (n = 5) tested had any effect on topo binding to NHDF surfaces (Figure. 1C).

Negative controls were performed by incubating NHDF with equal concentrations of BSA-PE combined with anti-BSA antibody, presumably also in the form of IC. A second negative control was used: human heat-aggregated gamma globulins as an Fc

receptor blocking agent added prior to incubation with topo/anti-topo IC. Negative results obtained with both controls indicated that the amplification of topo binding was specific to topo/anti-topo IC and was not Fc receptor mediated (data not shown).

To evaluate the potential association between anti-topo antibody titers in whole IgG purified from anti-topo-positive SSc sera (OD) from ELISA and their respective amplifying effects on topo-PE binding to NHDF surfaces (MFI) from flow cytometry, univariate linear regression analysis was performed. As shown in Figure. 2A, there was a strong correlation between these two variables ($P < 0.0001$) and, with a Pearson correlation coefficient of 0,86, these results strongly suggest that the observed increased binding of topo to NHDF surfaces seen in Figure. 1 is directly associated with the presence and titers of anti-topo autoantibodies in whole IgG preparations.

To further confirm that the amplifying effects observed with topo/anti-topo IC were dependent upon the presence of anti-topo autoantibodies, anti-topo antibody depletion was performed. The efficacy of anti-topo depletion was first controlled by immunoblotting on purified topo. As shown in Figure. 2B, all of the anti-topo-depleted IgG tested had lost their reactivity against topo as compared with the corresponding whole IgG. The amplifying efficacy of these 2 groups of IgG on topo binding to NHDF surfaces was compared by fluorescence microscopy (Figure 2C). Here, topo directly coupled to a fluorochrome (topo-Cy3) was added to live, adherent, unfixed and non-permeabilized NHDF for 30 minutes simultaneously with whole IgG anti-topo or with their corresponding anti-topo-depleted IgG. As shown in Figure 2C, in the presence of topo/anti-topo IC (left panel), topo-Cy3 displayed a uniform and strong fluorescent pattern over the cell surface while the use of anti-topo-depleted IgG preparations strongly diminished the fluorescent intensity of topo-Cy3 bound to NHDF (right panel). Figure 2D shows that all of the anti-topo-depleted IgG preparations tested revealed a significant loss in their amplifying activity on topo-Cy3 binding as compared with their corresponding whole IgG preparations ($n = 4$, SSc patients). Taken together, these data strongly suggest that anti-topo antibodies from SSc patients amplify topo binding to NHDF surfaces.

Topo binds to NHDF surfaces by interacting with heparan sulfate (HS) chains.

Based on the ability of topo to bind heparin (27, 28) and because HSPG act as coreceptors for several proteins (19), the possibility was investigated that topo uses HS chains as coreceptors on NHDF. First, NHDF were incubated for one hour in the presence or absence of heparitinase (Hep), a specific enzyme that cleaves the HS chains from proteoglycans (29), prior to incubation with topo or topo/anti-topo IC. The efficacy of HS chain removal by Hep treatment was confirmed with HS chain-specific antibody and appeared to be nearly complete (Figure. 3A). As shown in Figure 3A, degradation of HS chains with Hep also lead to an important and significant decrease of topo and topo/anti-topo IC binding to the cell surface. The cell surface expression of CD51, which does not bear HS chains and should therefore not be sensitive to Hep treatment, was used as a negative control. As shown in Figure 3A, the presence of CD51 at the cell surface was not affected by Hep treatment. The presence of HS chains and the ability of topo/anti-topo IC binding following exposure of NHDF to Hep were also investigated by fluorescence microscopy. As shown in Figure 3B, HS chain expression (green) and topo/anti-topo IC binding (red) decreased following Hep treatment (panels b and d, respectively) as compared with untreated cells (panels a and c). Taken together, these data show that topo and topo/anti-topo IC bind to HS chains on NHDF, thus suggesting that HSPG act as coreceptors. Experiments to identify the ultimate cell surface receptor for topo on NHDF are currently in progress in our laboratory.

Heparin inhibits binding of topo and topo/anti-topo IC to HS on NHDF surfaces. It has been demonstrated that heparin, a highly-sulfated glycosaminoglycan, can inhibit topo enzymatic activity *in vitro* (27, 28). These observations thus led to the hypothesis that heparin can inhibit binding of topo to HS and prevent the accumulation of topo/anti-topo IC at the surface of fibroblasts. In order to verify this hypothesis, competition assays were performed between topo or topo/anti-topo IC and heparin. Here, topo-PE either alone or with whole IgG purified from anti-topo positive SSc sera were added to NHDF simultaneously with unfractionated heparin (UFH) and cells were

examined by flow cytometry. As shown in Figure 4A, the amount of topo and topo/anti-topo IC that bound to HS on NHDF was markedly reduced in the presence of UFH (black and red dotted lines, respectively) as compared with untreated cells (black and red thick lines), thus suggesting that UFH could be used to prevent the binding of topo/anti-topo IC to fibroblasts.

Fractionated heparin, or low molecular weight heparin (LMWH), is a product of the breakdown of UFH. LMWH has a similar mechanism of action as UFH and since several LMWH products are commercially available, their efficacy to inhibit topo/anti-topo IC binding to NHDF surfaces was investigated. As shown in Figure 4B, the inhibiting effect of UFH on topo/anti-topo IC binding to NHDF was concentration-dependent with a maximal activity at 1 µg/ml and was comparable to those obtained with the two LMWH tested. Indeed, binding of topo/anti-topo IC to NHDF was reduced in a dose-dependent manner by dalteparin and enoxaparin, reaching approximately 95 % inhibition at concentrations of 10,0 µg/ml. In contrast, fondaparinux, a fully synthetic pentasaccharide, had little or no effect on the binding of topo/anti-topo IC to NHDF, indicating that this molecule is completely inactive as a competitor. The effect of heparin and its derivatives on IC binding was next evaluated by fluorescence microscopy and again, like UFH, dalteparin reduced the staining of topo/anti-topo IC on NHDF as compared with untreated cells (Figure 4C). Similar results were obtained with enoxaparin (data not shown). Taken together, these results indicate that LMWH have a similar mechanism of action as UFH, suggesting that dalteparin and enoxaparin can also be used as powerful inhibitors of topo/anti-topo IC binding to NHDF surfaces.

Heparin dissociates topo and topo/anti-topo IC bound to HS on NHDF surfaces. Since SSc is a disease that often goes undiagnosed and because anti-topo autoantibodies are produced very early during its development, it became of interest to test whether heparin or its derivatives could dissociate topo or topo/anti-topo IC bound to NHDF surfaces. Topo-PE either alone or simultaneously with anti-topo autoantibodies were incubated with NHDF for 30 minutes, unbound molecules washed away, and

increasing concentrations of UFH subsequently added. As seen in Figure 5A, dissociation of both topo alone or topo/anti-topo IC from HS chains on NHDF increased in a dose-dependent manner in response to UFH. A similar dose-dependent effect with LMWH dalteparin and enoxaparin was observed on topo/anti-topo IC binding (Figure 5B). Again, fondaparinux only caused very little dissociation of topo/anti-topo IC from NHDF. Dissociation assays were similarly performed with IgG purified from 8 anti-topo-positive SSc sera tested with both UFH and dalteparin at concentrations of 10 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 5C). Similar results were obtained with enoxaparin (data not shown). These findings suggest that UFH as well as dalteparin and enoxaparin could be used to remove topo/anti-topo IC bound to NHDF surfaces.

DISCUSSION

Previous work has demonstrated that the nuclear autoantigen topo binds specifically to the surface of fibroblasts and recruits anti-topo autoantibodies, which lead to the adhesion and activation of monocytes (5). Such an activation of the immune system may contribute to the pathogenesis of SSc via initiation of the fibrotic cascade typical of SSc pathogenesis. Studies presented here were undertaken to characterize the molecular interactions between topo and fibroblast surfaces to elucidate the pathogenic role of topo/anti-topo IC in SSc.

The present study clearly indicates that anti-topo autoantibodies amplify topo binding to fibroblast surfaces. This amplification was specific for topo/anti-topo IC and strongly correlated with the presence and titers of anti-topo autoantibodies. This is consistent with other findings demonstrating that anti-topo autoantibody titers are correlated with the severity and activity of the disease (30, 31) and that they are associated with the worst form of SSc (31-33). Moreover, these data are also consistent with a recent paradigm stating that the pathogenicity of autoantibodies is amplified when autoantigens are accessible for IC formation (34).

Binding of topo to fibroblast surfaces involves a membrane receptor and results presented herein identified the membrane partner responsible for topo and consequently topo/anti-topo IC specific binding to fibroblast surfaces. The presence of HS chains on HSPG was shown to be necessary for topo and topo/anti-topo IC binding. Binding to proteoglycans on cell surfaces is a well-known process used by many proteins (19, 21, 35). Indeed, HSPG represent low affinity but high capacity coreceptors that facilitate the presentation of a ligand to its high affinity signalling receptor (19). Current work is in progress to identify the ultimate topo receptor on fibroblast surfaces. Hence, HSPG present on the surface of fibroblasts are instrumental in the process leading to the putative initiation of the inflammatory cascade.

Since topo was shown to interact with HS chains, heparin, a glycosaminoglycan analogue of HS, was proposed to interfere with topo binding and consequently with the accumulation of topo/anti-topo IC on fibroblast surfaces. The presence of UFH as well as the two LMWH tested, namely dalteparin and enoxaparin, markedly competed with topo/anti-topo IC binding to HS chains on fibroblast surfaces. Furthermore, topo/anti-topo IC bound to HS chains could be dissociated from fibroblast surfaces by UFH and LMWH. In contrast to UFH and LMWH, fondaparinux, a completely synthetic molecule, caused very little inhibition and dissociation of topo/anti-topo IC binding suggesting that this molecule is inactive in our model. Fondaparinux being composed of a pentasaccharidic sequence shorter than those of the other LMWH tested, the sequence involved in the interference with topo and topo/anti-topo IC binding to HS chains is probably absent from its chain composition.

In Figure 6, a mechanism is proposed for the pathogenic role of topo/anti-topo IC binding to fibroblast surfaces as contributor to the initiation of fibrosis in SSc patients (left) as well as the effects of its perturbation by UFH or LMWH treatments (right). Topo, originally released from apoptotic endothelial cells, binds to HSPG on bystander fibroblasts. In the presence of anti-topo autoantibodies, topo binding to HSPG is amplified (left panel). Topo/anti-topo IC accumulation on the cell surface induces adhesion and activation of monocytes, as reported (5), and would thus be associated with the amplification of the immune response, due to proinflammatory cytokines released by activated monocytes, and to fibrosis, due to local secretion of profibrotic cytokines by activated fibroblasts. Hence, the presence of anti-topo in SSc patients would be directly associated with increased immune responses and could drive the disease toward a more severe and unremitting fibrotic phenotype, as observed *in vivo*. In contrast, as illustrated by the right panel, the presence of UFH or LMWH is predicted to inhibit topo binding, either by the prevention of topo/anti-topo IC binding to HS chains or even by their dissociation, which would result in the inhibition of the inflammatory cascade by blocking the activation of the immune system and possibly the resulting fibrosis.

Overall, these data support a potential role for anti-topo autoantibodies in the pathogenesis of SSc when complexed to their cognate autoantigen topo and, moreover, put forward a novel therapeutic approach having the potential to prevent or reverse the early development of SSc-associated fibrosis.

REFERENCES

1. Cano PO, Jerry LM, Sladowski JP, Osterland CK. Circulating immune complexes in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 1977;29(2):197-204.
2. Fischbach M, Char D, Christensen M, Daniels T, Whaley K, Alspaugh M, et al. Immune complexes in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1980;23(7):791-5.
3. Zhao X, Okeke NL, Sharpe O, Batliwalla FM, Lee AT, Ho PP, et al. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(4):R94.
4. Putterman C. New approaches to the renal pathogenicity of anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2004;3(2):7-11.
5. Henault J, Robitaille G, Senecal JL, Raymond Y. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum*. 2006;54(3):963-73.
6. Naparstek Y, Ben-Yehuda A, Madaio MP, Bar-Tana R, Schuger L, Pizov G, et al. Binding of anti-DNA antibodies and inhibition of glomerulonephritis in MRL-lpr/lpr mice by heparin. *Arthritis Rheum*. 1990;33(10):1554-9.
7. van Bruggen MC, Walgreen B, Rijke TP, Corsius MJ, Assmann KJ, Smeenk RJ, et al. Heparin and heparinoids prevent the binding of immune complexes containing nucleosomal antigens to the GBM and delay nephritis in MRL/lpr mice. *Kidney Int*. 1996;50(5):1555-64.
8. Hedberg A, Fisman S, Fenton KA, Fenton C, Osterud B, Mortensen ES, et al. Heparin exerts a dual effect on lupus nephritis by enhancing enzymatic chromatin degradation and preventing chromatin-binding in glomerular membranes. *Arthritis Rheum*. 2010.

9. Scussel-Lonzetti L, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Rich E, Goulet JR, et al. Predicting mortality in systemic sclerosis: analysis of a cohort of 309 French Canadian patients with emphasis on features at diagnosis as predictive factors for survival. *Medicine (Baltimore)*. 2002;81(2):154-67.
10. Hesselstrand R, Scheja A, Shen GQ, Wiik A, Akesson A. The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2003;42(4):534-40.
11. Henault J, Tremblay M, Clement I, Raymond Y, Senecal JL. Direct binding of anti-DNA topoisomerase I autoantibodies to the cell surface of fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(10):3265-74.
12. Senecal JL, Henault J, Raymond Y. The pathogenic role of autoantibodies to nuclear autoantigens in systemic sclerosis (scleroderma). *J Rheumatol*. 2005;32(9):1643-9.
13. Robitaille G, Christin MS, Clement I, Senecal JL, Raymond Y. Nuclear autoantigen CENP-B transactivation of the epidermal growth factor receptor via chemokine receptor 3 in vascular smooth muscle cells. *Arthritis Rheum*. 2009;60(9):2805-16.
14. Nihtyanova SI, Denton CP. Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(2):112-6.
15. Fineschi S, Goffin L, Rezzonico R, Cozzi F, Dayer JM, Meroni PL, et al. Antifibroblast antibodies in systemic sclerosis induce fibroblasts to produce profibrotic chemokines, with partial exploitation of toll-like receptor 4. *Arthritis Rheum*. 2008;58(12):3913-23.
16. Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, Testoni C, Mallone R, Gabrielli A, et al. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2002;46(6):1602-13.

17. Ronda N, Gatti R, Giacosa R, Raschi E, Testoni C, Meroni PL, et al. Antifibroblast antibodies from systemic sclerosis patients are internalized by fibroblasts via a caveolin-linked pathway. *Arthritis Rheum.* 2002;46(6):1595-601.
18. Jacob L, Viard JP, Allenet B, Anin MF, Slama FB, Vandekerckhove J, et al. A monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody binds to a 94-kDa cell-surface protein on various cell types via nucleosomes or a DNA-histone complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(12):4669-73.
19. Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 1991;64(4):841-8.
20. Gallagher JT. Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu. *J Clin Invest.* 2001;108(3):357-61.
21. Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:729-77.
22. Kreuger J, Spillmann D, Li JP, Lindahl U. Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity. *J Cell Biol.* 2006;174(3):323-7.
23. Parish CR. Heparan sulfate and inflammation. *Nat Immunol.* 2005;6(9):861-2.
24. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 1980;23(5):581-90.
25. Zeileis A. Object-oriented computation of sandwich estimators. *Journal of Statistical Software* 2006;16(9):1-16.
26. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing. Vienna, Austria; 2010.

27. Kovalszky I, Dudas J, Olah-Nagy J, Pogany G, Tovary J, Timar J, et al. Inhibition of DNA topoisomerase I activity by heparan sulfate and modulation by basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Biochem.* 1998;183(1-2):11-23.
28. Ishii K, Katase A, Andoh T, Seno N. Inhibition of topoisomerase I by heparin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982;104(2):541-7.
29. Fannon M, Nugent MA. Basic fibroblast growth factor binds its receptors, is internalized, and stimulates DNA synthesis in Balb/c3T3 cells in the absence of heparan sulfate. *J Biol Chem.* 1996;271(30):17949-56.
30. Diot E, Giraudeau B, Diot P, Degenne D, Ritz L, Guilmot JL, et al. Is anti-topoisomerase I a serum marker of pulmonary involvement in systemic sclerosis? *Chest.* 1999;116(3):715-20.
31. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA, Jr., Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(5):1363-73.
32. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Kawakami Y, Tojo T. Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(5):1074-84.
33. Weiner ES, Hildebrandt S, Senecal JL, Daniels L, Noell S, Joyal F, et al. Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud's disease. A prospective study. *Arthritis Rheum.* 1991;34(1):68-77.
34. Munoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(5):280-9.
35. Rek A, Brandner B, Geretti E, Kungl AJ. A biophysical insight into the RANTES-glycosaminoglycan interaction. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1794(4):577-82.

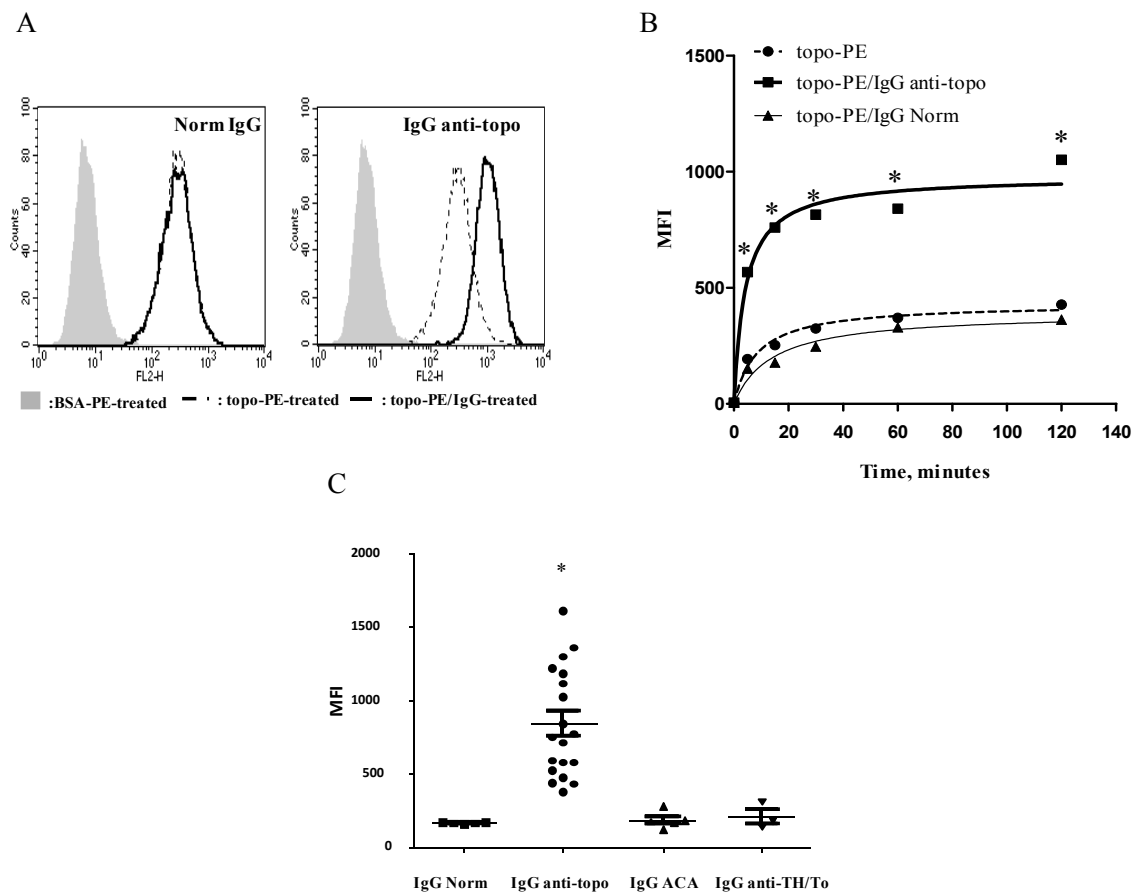


Figure 1. Anti-topo autoantibodies from systemic sclerosis (SSc) patients amplify topo binding to normal human dermal fibroblast (NHDF) surfaces. **A**, Results of flow cytometry analysis of topo-PE binding to NHDF with or without IgG purified from normal serum (left panel) or from anti-topo-positive SSc serum (right panel). The number of positive intact cells versus fluorescence intensity is presented. Controls were incubated with BSA-PE and are depicted as shaded areas. Dotted lines represent topo-PE binding; solid lines represent topo-PE/IgG binding. **B**, Time course of topo-PE binding to NHDF with or without anti-topo or normal IgG. Data are presented as the mean fluorescence intensity (MFI). Results are representative of at least 3 independent experiments. * = $P \leq 0.0001$ versus topo-treated cells. **C**, Results of flow cytometry analysis of topo-PE binding to NHDF with IgG from

anti-topo-positive SSc sera (n=19), normal sera (n = 5), anti-TH -positive SSc sera (n = 3), or anti-centromere (ACA)-positive SSc sera (n = 5). Data are presented as MFI. Topo binding to NHDF was significantly increased in the presence of IgG from anti-topo-positive SSc sera (* = $P \leq 0.0001$ versus normal and anti-topo-negative SSc sera).

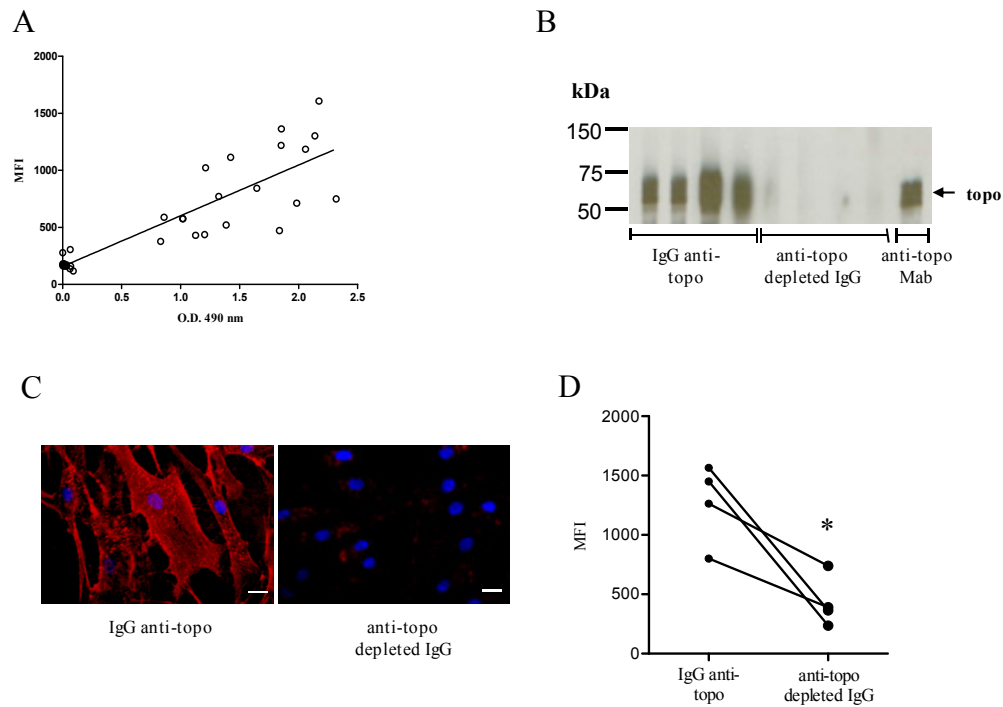


Figure 2. Effects of anti-topo IgG on topo binding to NHDF surfaces. **A**, Autoantibodies to topo were determined by ELISA as outlined in Materials and Methods in sera from 19 selected anti-topo-positive SSc patients, 8 anti-topo-negative SSc patients and 5 normal controls. Shown are the correlation between MFI of topo-PE/IgG binding to NHDF surfaces obtained by flow cytometry analysis and optical density (O.D) values obtained by ELISA with all selected patients, $r = 0.86$ and $P < 0.0001$. **B**, The efficacy of anti-topo depletion was confirmed by immunoblotting on purified topo. **C** and **D**, The effects of whole IgG anti-topo on topo binding to NHDF surfaces were compared with those of the corresponding anti-topo-depleted IgG, as determined using fluorescence microscopy (**C**) and flow cytometry analysis (**D**). In **C**, Topo-Cy3 and IgG anti-topo (left panel; red) or anti-topo-depleted IgG (right panel) were added to live, adherent, unfixed and non-permeabilized NHDF for 30 minutes. Also shown are Hoechst 33258-stained nuclei (blue).

Bar = 20 μm . Results are representative of 3 different experiments and different anti-topo-depleted IgG. In **D**, each data point represents the mean of triplicate determinations for each IgG preparation (n = 4). * = $P \leq 0.0057$ versus whole IgG anti-topo.

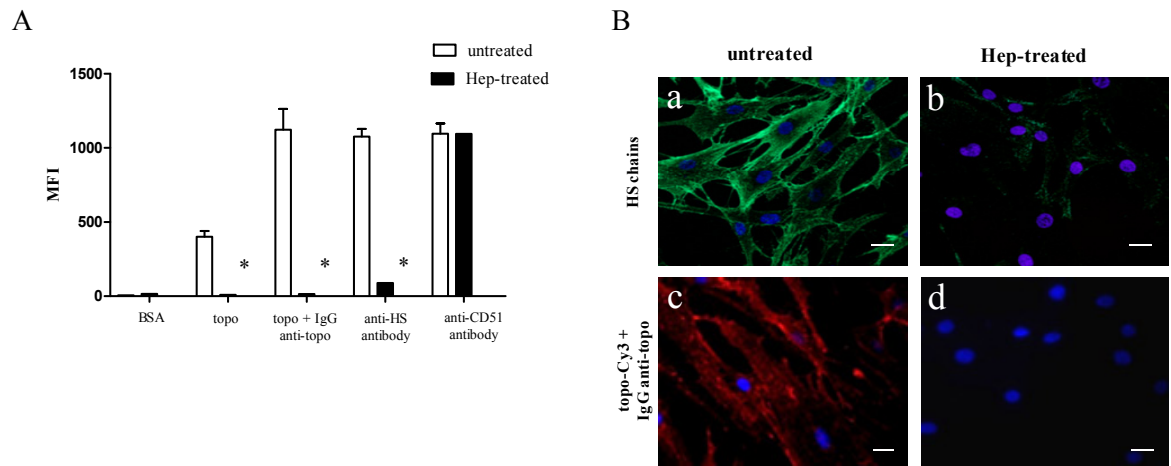


Figure 3. Interaction of topo and topo/anti-topo immune complexes with heparan sulfate (HS) chains on NHDF surfaces. Shown are results of flow cytometry analysis (**A**) and fluorescence microscopy (**B**) of the binding of topo and topo/anti-topo immune complexes to HS on NHDF. NHDF were pretreated or not with heparitinase (Hep) for one hour and incubated with topo-PE (**A**) or topo-Cy3 (**B**) and IgG purified from anti-topo-positive SSc sera for 30 minutes. **A**, The expression of HS on NHDF was demonstrated with an antibody specific to HS chains and a PE-conjugated secondary antibody. HS chains were lost after Hep treatment. The CD51 expression level, an unrelated cell surface molecule, did not change with Hep treatment. Values are the mean MFI and SEM. * = $P \leq 0.007$ versus untreated cells. Results are representative of 3 independent experiments. **B**. Topo-Cy3 (red) and IgG purified from anti-topo-positive SSc sera were added to live, adherent, unfixed and non-permeabilized NHDF for 30 minutes (a and b). The expression of HS on NHDF was visualized with an antibody specific to HS chains and a FITC-conjugated secondary antibody (green) (c and d). Also shown are Hoechst 33258-stained nuclei (blue). Bar = 20 μm. Results are representative of 3 different experiments.

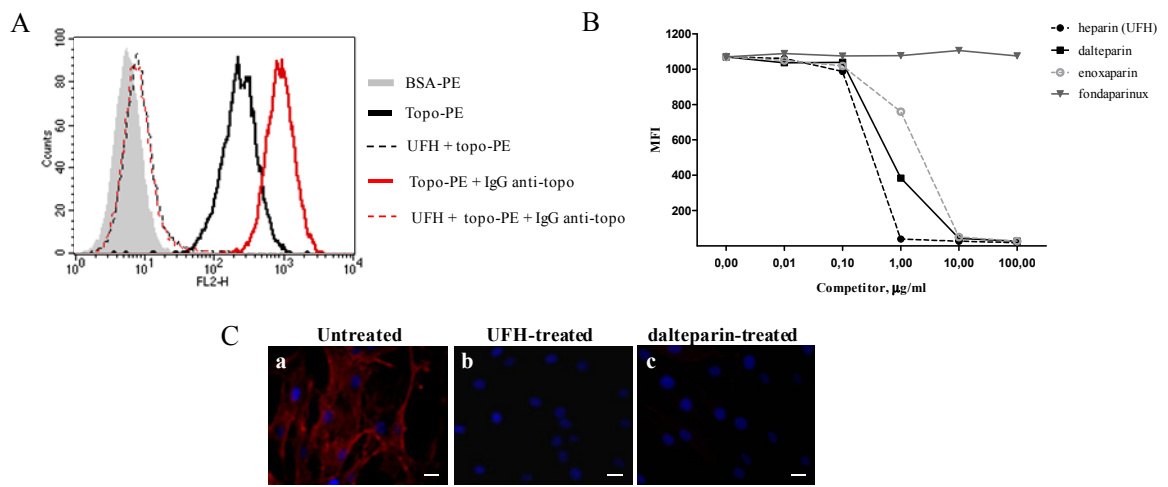


Figure 4. Unfractionated heparin (UFH) and low molecular weight heparin (LMWH) block the interaction of topo/IgG anti-topo immune complexes with HS chains on NHDF surfaces. Shown are results of flow cytometry analysis (**A** and **B**) and fluorescence microscopy (**C**) of the effects of UFH and LMWH (dalteparin, enoxaparin and fondaparinux) on the binding of topo/anti-topo immune complexes to NHDF. **A**, NHDF were incubated with topo-PE either alone or with IgG purified from anti-topo positive SSc serum for 30 minutes at 25°C. Where required, UHF (10 $\mu\text{g/ml}$) were added to the cells simultaneously with topo or topo/anti-topo IgG immune complexes. The number of positive intact cells versus fluorescence intensity is presented. Controls were incubated with BSA-PE and are depicted as a shaded area. Solid black lines represent topo-PE binding; dotted black lines represent topo-PE binding in the presence of UFH; solid red lines represent topo-PE/IgG anti-topo binding; dotted red lines represent topo-PE/IgG anti-topo binding in the presence of UFH. **B**, NHDF were incubated with topo-PE/IgG anti-topo and with increasing concentrations of UFH or LMWH for 30 minutes. Data are presented as MFI. Results are representative of at least 3 independent experiments. **C**, NHDF were incubated with topo-Cy3/IgG anti-topo (red) simultaneously with UFH or dalteparin (10

μg/ml) for 30 minutes. Also shown are Hoechst 33258-stained nuclei (blue). Bar = 20 μm. Results are representative of 3 different experiments.

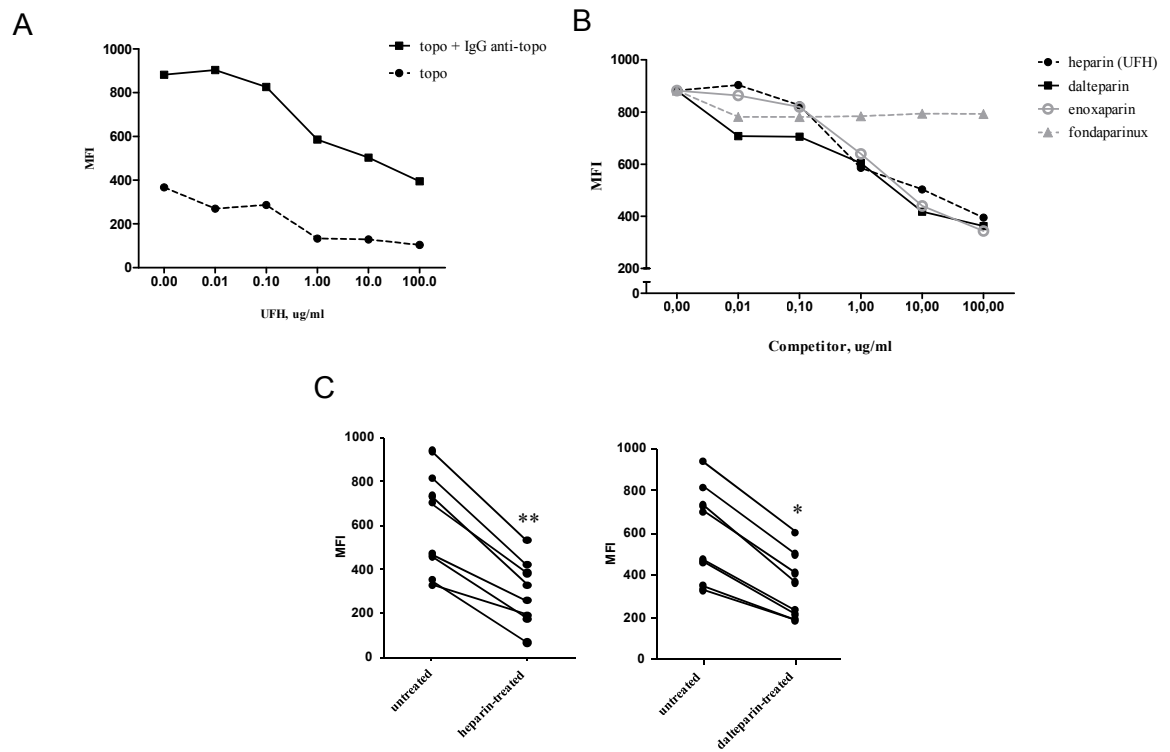


Figure 5. Dissociation of topo/IgG anti-topo immune complexes from HS chains on NHDF surfaces by UFH and LMWH. **A**, NHDF were first incubated with topo-PE either alone or simultaneously with anti-topo IgG for 30 minutes, followed by a second incubation with increasing concentrations of UFH for 30 minutes to disrupt bound topo-PE/IgG anti-topo immune complexes. Data are presented as the MFI and are representative of at least 3 independent experiments. **B**, The disrupting effect of UFH on the binding of topo/anti-topo immune complexes to NHDF was compared to those of several LMWH. In **C**, the concentration of UFH and dalteparin used was 10 $\mu\text{g/ml}$ and each data point represents the mean of duplicate determinations for each IgG preparation ($n = 8$). ** = $P \leq 0.0067$ and * = $P \leq 0.0179$ versus untreated.

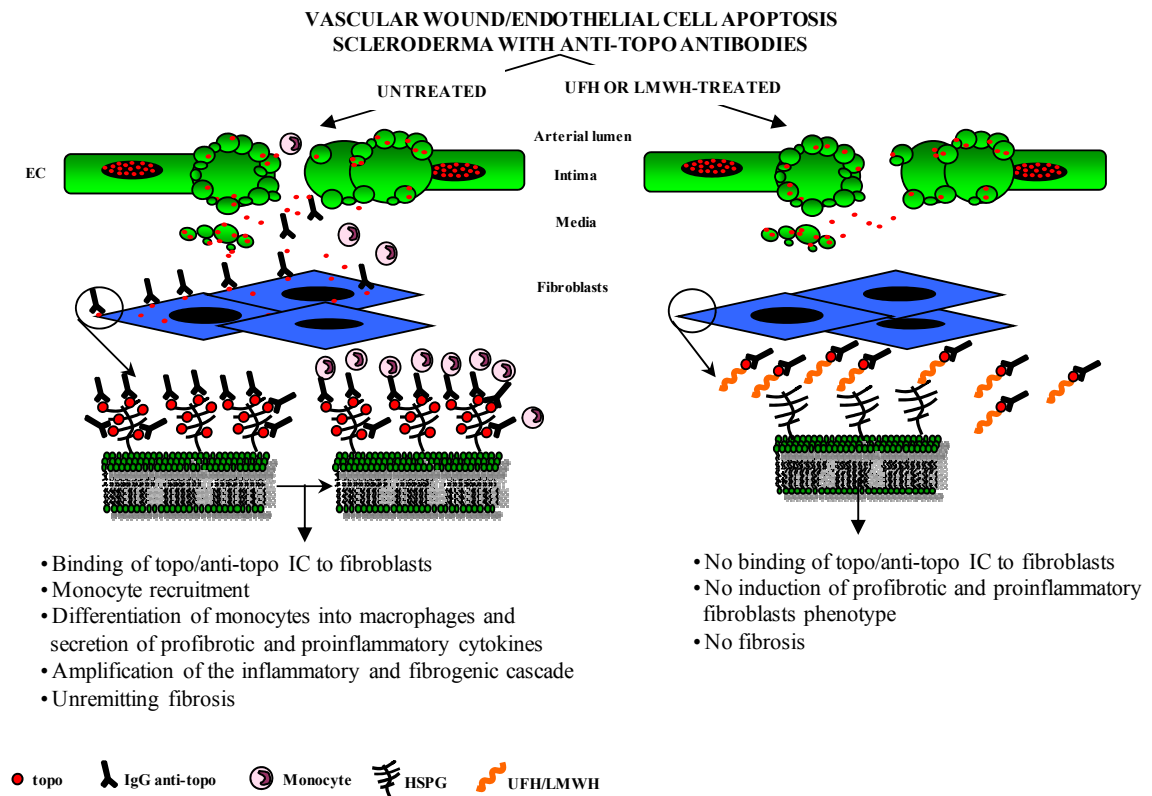


Figure 6. Proposed signaling mechanism, illustrating the pathogenic role of topo/anti-topo immune complexes on fibroblasts as a contributor to the initiation of fibrosis in SSc patients (left) as well as the effects of its perturbation by UFH or LMWH treatments (right).

Discussion générale

Une caractéristique importante de la ScS est la présence d'auto-anticorps dans la grande majorité des sera de patients (67). À ce jour, leur rôle demeure principalement d'une utilité diagnostique. En effet, puisqu'ils sont associés à des manifestations cliniques spécifiques, ils permettent d'émettre un pronostic et de suivre l'évolution de la maladie. L'implication des auto-anticorps dans la pathogenèse de la ScS est un sujet de controverse et est non résolue. Certains auteurs suggèrent qu'ils peuvent contribuer au développement et au maintien de la maladie tandis que d'autres croient qu'ils sont plutôt un épiphénomène. Toutefois, plusieurs données récentes suggèrent de plus en plus un rôle actif dans la maladie (3-7). Parallèlement, plusieurs études s'intéressant à la cible des auto-anticorps, les auto-antigènes, émergent dans la littérature. En effet, des rôles extracellulaires sont attribués à plusieurs auto-antigènes ciblés dans les maladies auto-immunes (8-11). De ce fait, le rôle simplement passif des auto-antigènes est grandement remis en question. Il devient donc très intéressant de se questionner sur l'implication des auto-antigènes dans la ScS avant d'établir un rôle possible pour les auto-anticorps.

La topo est un auto-antigène ciblé dans la ScS. En effet, les anti-topo sont des auto-anticorps associés à une importante atteinte dermique et au développement de fibrose pulmonaire, caractéristiques de la forme diffuse de la ScS (55, 59, 65, 196). Le développement d'une fibrose cutanée ou viscérale est le résultat d'une surproduction et d'un dépôt excessif de MEC. Les cellules responsables de la synthèse de la majorité de la MEC sont les fibroblastes et leur activation soutenue est grandement associée à la ScS (151). Or, l'interaction de l'auto-antigène topo avec les fibroblastes est à la base de notre étude (13).

Conséquemment au manque de connaissance face à la pathogenèse de la ScS, aucun traitement ne permet de la guérir. Il est possible de ralentir sa progression, mais la ScS demeure aujourd'hui une maladie incurable. La compréhension des dérèglements cellulaires favoriserait la progression de la recherche et l'avènement de traitements efficaces.

Rôle de l'auto-antigène topo dans la sclérose systémique

Il a d'abord été démontré que la topo, provenant de cellules endothéliales en apoptose, pouvait se lier à la surface des fibroblastes (13). Suite à l'émergence des études face aux auto-antigènes (8-11), la première partie de l'étude a été l'évaluation des effets biologiques de la topo sur la physiologie du fibroblaste. Puisque plusieurs auto-antigènes, incluant la topo, ont démontré des effets chimiotactiques sur différents types cellulaires (10), nous avons d'abord évalué son pouvoir migratoire sur sa cellule cible. La migration du fibroblaste est une étape essentielle impliquée dans des processus physiologiques normaux tels que la réparation de blessure ou des processus pathologiques tels que la fibrose. Dans un contexte physiologique, certains facteurs de croissance, tels que le TGF- β , le PDGF et le FGF, stimulent la migration des fibroblastes et permettent la prolifération cellulaire et la sécrétion de MEC au lieu approprié. Nous avons démontré que la topo stimulait également la migration des fibroblastes dans un modèle *in vitro* de réparation de blessure (article no. 1, Figure 1).

La migration cellulaire nécessite l'activation de voies de signalisations intracellulaires. D'ailleurs, l'activation de la voie des MAPK y est souvent associée (355). Nous avons identifié une voie de signalisation menant à l'activation des MAPK (ERK1/2 et p38) suite à la liaison de la topo à la surface du fibroblaste. En effet, la phosphorylation en amont de la PLC γ 1 et de c-Raf entraînent l'activation des MAPK (article no. 1, Figure 2). Ces résultats suggèrent que la topo possède un pouvoir migratoire sur les fibroblastes suite à l'activation de ces candidats intracellulaires.

Somme toute, la topo, libérée dans le milieu extracellulaire suite à une blessure à l'endothélium, joue un rôle extracellulaire dans la physiologie du fibroblaste en favorisant le processus de réparation de blessure d'abord par l'induction de la migration cellulaire.

Caractérisation de l'interaction de l'auto-antigène topo avec les fibroblastes

Plusieurs auto-antigènes intracellulaires présentant des fonctions extracellulaires additionnelles, telles que la migration cellulaire, agissent via l'interaction avec des RCPG présents sur leur cellule cible (4, 8, 304, 305). En effet, il a été démontré que ces auto-antigènes possèdent des activités chimiotactiques suite à la liaison à des récepteurs de chimiokines, une sous-famille de RCPG (305). Les résultats présentés dans l'article no. 1 ont permis d'identifier des rôles extracellulaires de la topo qui sont dépendants d'une activation d'un RCPG α_i (article no. 1, Figure 3). Jusqu'ici, l'ensemble de nos résultats, appuyé par la littérature (4, 8, 304, 305), suggérait l'implication d'un récepteur de chimiokine comme récepteur membranaire pour la topo.

Bien que le CCR7 soit essentiel dans le trafic des lymphocytes et des cellules dendritiques dans les organes lymphoïdes secondaires (343), son implication dans le développement de processus fibrotiques, principalement en présence d'un de ses ligands, le CCL21 (348, 351, 352), a été démontrée. Bien que la présence du CCR7 à la surface des fibroblastes normaux soit controversée (347), les résultats de notre étude ont démontré son expression à la surface des fibroblastes normaux du derme (article no. 1, Figure 5). Récemment, une étude a démontré que la migration de lymphocytes T suite à l'interaction du CCL21 avec le CCR7 entraînait l'activation de la PLC γ 1 et des ERK1/2 (367). Puisque nous avons démontré que la topo activait ces mêmes candidats intracellulaires, il devenait d'autant plus intéressant de vérifier la possibilité que la topo interagisse avec le même partenaire que le CCL21 en surface cellulaire. D'abord, nos résultats ont démontré *in vitro* une interaction directe et dose-dépendante de la topo avec le CCR7 (article no. 1, Figure 6A). De plus, nous avons observé une compétition entre le CCL21 et la topo pour la surface cellulaire du fibroblaste (article no. 1, Figure 4B) et directement pour le CCR7 (article no. 1, Figure 6B). De façon opposée, le CCL19, second agoniste du CCR7, n'interfère pas avec la liaison de la topo à la surface cellulaire (article no. 1, Figure 4B). Toutefois, dans le modèle d'interaction *in vitro*, le CCL19 interfère avec la liaison de la topo avec le CCR7

mais, comparativement à celle observée avec le CCL21 (article no. 1, Figure 6B), cette compétition n'est pas dose-dépendante. Ce résultat suggère davantage un encombrement stérique qu'une compétition pour le même site de liaison. Ainsi, nos résultats proposent que la topo interagit avec le CCR7 en surface cellulaire de façon similaire au CCL21. Ce résultat est soutenu par d'autres études démontrant que les 2 ligands du CCR7, le CCL19 et le CCL21, n'entraînent pas les mêmes effets cellulaires suite à son activation (349, 363, 364). Jusqu'à maintenant, l'ensemble de nos résultats suggèrent que la topo influence la physiologie du fibroblaste en activant le CCR7.

Dans une étude précédente, notre groupe a démontré que la liaison de la topo était spécifique aux fibroblastes puisqu'une très faible liaison était observée au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses (13). Le CCR7 se retrouvant sur d'autres types cellulaires, il s'avère peu probable qu'il soit responsable de la spécificité de la liaison de la topo sur le fibroblaste. De plus, la compétition pour la liaison de la topo à la surface cellulaire par le CCL21 n'étant pas complète, (article no. 1, Figure 4B), cela suggère l'implication d'un autre récepteur pour la topo.

Les ligands de plusieurs récepteurs de chimiokines utilisent les PG présents en surface cellulaire à titre de corécepteur pour ensuite lier leur récepteur spécifique (324, 333, 343, 387). En effet, par son abondance à la surface cellulaire, le corécepteur agit à titre de récepteur de faible affinité mais de haute capacité pour le ligand et le concentre au niveau de son récepteur de forte affinité (324). Au niveau des auto-antigènes bifonctionnels, la participation des PG a été démontrée, entre autres, dans l'activation cellulaire médiée par l'auto-antigène HMGB1 (310). Puisque la topo est une protéine liant l'héparine (382, 383) et que les chaînes HS, GAG analogues de l'héparine, sont abondamment présentes à la surface des fibroblastes, nous voulions déterminer si la topo pouvait également lier cette famille de PG (HSPG). D'ailleurs, les HSPG représentent la famille de PG la plus impliquée à titre de corécepteur (331).

Les résultats présentés dans l'article no. 2 démontrent d'abord une forte interaction de la topo avec les HSPG puisqu'un traitement enzymatique clivant les chaînes HS entraîne

une diminution importante de la liaison de la topo à la surface du fibroblaste (article no. 2, Figure 3A). L'interaction de la topo avec les HSPG à la surface cellulaire fut également confirmée par des techniques de fluorescence. La spécificité de l'interaction de la topo avec la surface du fibroblaste peut être la conséquence de sa liaison aux HSPG puisque la composition exacte des chaînes d'oligosaccharides varie selon les sources cellulaires et tissulaires, permettant ainsi une sélection spécifique pour les ligands (325, 327, 328). Toutefois, comme nous l'avons mentionné précédemment, il n'est pas impossible que la topo puisse se lier, de façon minimale, à la surface des fibroblastes en l'absence de chaînes HS en interagissant directement avec le CCR7. En effet, nous observons une faible liaison de la topo à la surface des fibroblastes malgré l'absence de HSPG. Cela dit, il serait possible que la topo libérée dans le milieu extracellulaire puisse affecter la physiologie d'autres types cellulaires, exprimant le CCR7, au site de la blessure vasculaire. Toutefois, l'absence d'HSPG spécifiques pour la topo limiterait cette interaction et puisqu'il existe une très forte capacité de liaison de la topo sur les HSPG à la surface des fibroblastes, celle-ci favoriserait ce type cellulaire. De plus, la libération de la topo étant très localisée et de faible concentration, nous croyons que l'interaction de la topo avec les HSPG des fibroblastes s'effectue très rapidement et que la topo ne demeure pas en circulation pour atteindre, s'il y a lieu, une autre cible cellulaire.

Puisque le CCL21 est également en mesure de lier les HSPG avec une forte affinité comparativement au CCL19 (343), il serait possible que la compétition observée entre la topo et le CCL21 pour la surface cellulaire (article no. 1, Figure 4B) soit davantage pour les HSPG que pour le CCR7. Toutefois, nous avons testé un autre ligand ayant un patron de liaison pour les HSPG semblable au CCL21 mais ne liant pas le CCR7, soit le CCL25 (388). Nous avons observé une absence de compétition entre le CCL25 et la topo pour la surface cellulaire (annexe, Figure A1) suggérant fortement que la compétition observée entre le CCL21 et la topo n'impliquait pas les HSPG mais fort probablement le CCR7. Toutefois, ces résultats devront être confirmés. Une façon simple de le faire serait d'évaluer les effets cellulaires médiés par la topo (article no. 1) en présence du CCL21. De ce fait, il

serait possible de confirmer que les effets biologiques induits par la topo sont dépendants de sa liaison au CCR7.

Ainsi, l'ensemble des résultats discutés jusqu'à maintenant suggère que la topo possède des fonctions additionnelles lorsque relâchée dans le milieu extracellulaire. Son relâchement serait rendu possible suite à une blessure de l'endothélium vasculaire et donc d'une apoptose des cellules endothéliales (13). D'ailleurs, l'apoptose des cellules endothéliales est un processus précoce dans la pathogenèse de la ScS qui a été démontré autant au niveau de modèles animaux sclérodermiques que chez des patients (108, 389). Un défaut dans l'élimination des corps apoptotiques pourrait entraîner un processus de nécrose tardive et ainsi permettre la libération de la topo dans le milieu extracellulaire. Ainsi, la topo pourrait se lier spécifiquement à la surface du fibroblaste en interagissant avec les HSPG à titre de corécepteurs et ensuite être présentée au CCR7 pour y effectuer ses fonctions biologiques. La topo serait donc caractérisée comme un auto-antigène pouvant servir de signal d'alarme provenant de tissus endommagés pour l'organisme et subséquemment participer au mécanisme normal de réparation de blessure (20-22) (Figure 4).

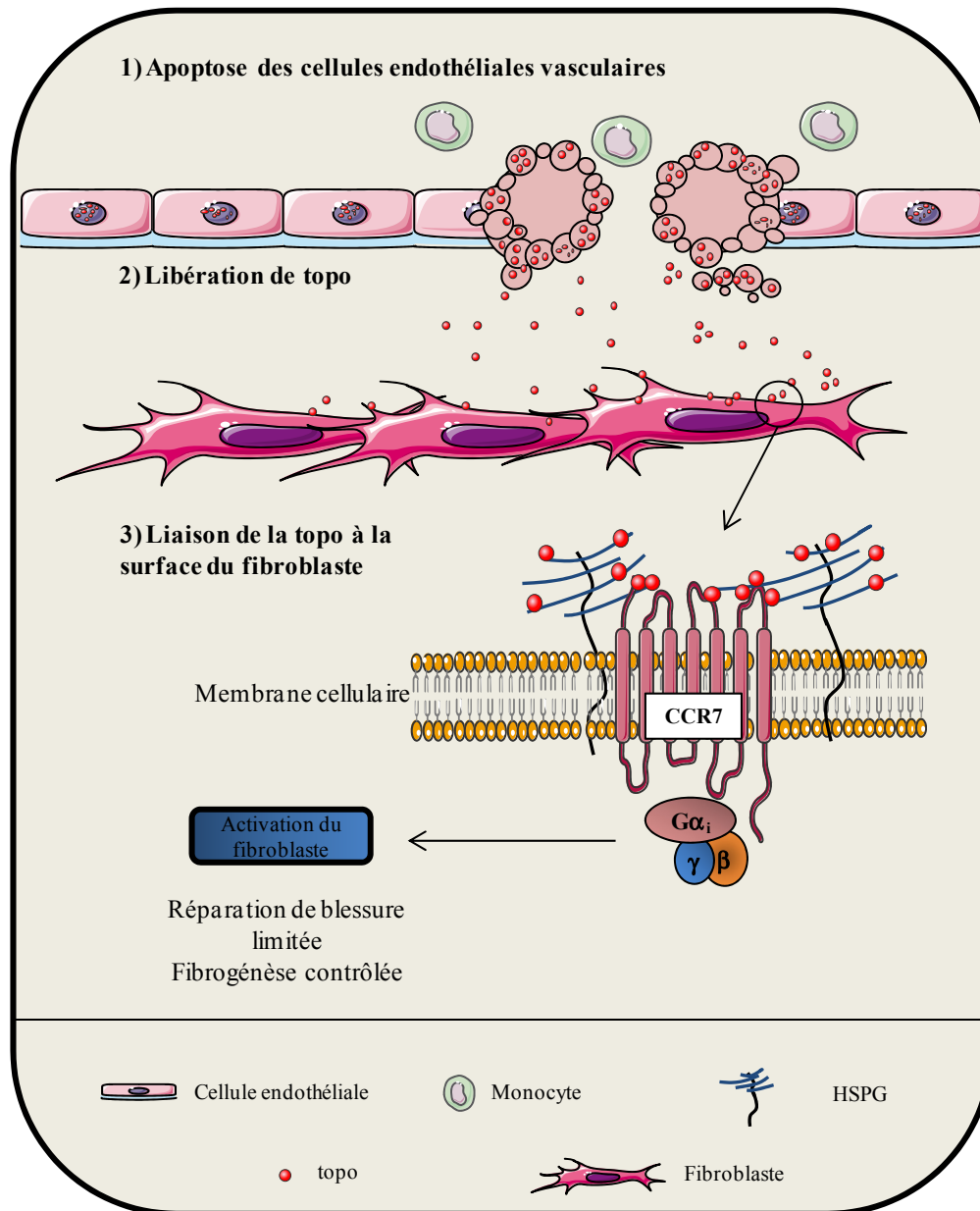


Figure 4. Hypothèse du rôle physiologique de l'auto-antigène ADN topoisomérase I chez le fibroblaste.

Rôle du complexe immuno topo/anti-topo dans la ScS

Notre modèle repose sur la liaison de la topo à la surface des fibroblastes. Il a été démontré que cette liaison entraîne d'abord le recrutement des anti-topo, présents chez certains patients sclérodermiques. La présence du complexe immuno à la surface des fibroblastes entraîne ensuite l'adhésion et l'activation monocytaire, contribuant ainsi au développement d'un contexte inflammatoire propice à l'évolution vers une fibrose, caractéristique de la ScS (13). D'un point de vue physiologique, l'apoptose des cellules endothéliales pourrait, en plus d'être la source de l'auto-antigène, contribuer au recrutement des anti-topo et celui des monocytes via une perméabilisation de l'endothélium vasculaire.

Dans la deuxième partie de l'étude (article no. 2), nous avons démontré que la topo se liait fortement aux HSPG mais surtout que cette liaison est amplifiée en présence d'IgG totales purifiées à partir de séra de patients anti-topo positifs (article no. 2, Figure 1). Nous avons démontré que l'amplification de la liaison de la topo était dépendante de la présence d'anti-topo dans les IgG totales (article no. 2, Figure 2B, C) et surtout que la présence d'autres auto-anticorps retrouvés dans la ScS n'entraînait pas cette amplification (article no. 2, Figure 1C). Ce phénomène d'amplification pourrait expliquer l'association entre la présence d'anti-topo et une forme plus sévère de la ScS (196, 197, 385). Par ailleurs, il a récemment été démontré que la pathogénicité des auto-anticorps est amplifiée en présence de l'auto-antigène par la formation de complexes immuns (280).

Dans la première partie de l'étude, nous avons démontré que la topo influençait la physiologie du fibroblaste de façon contrôlée (article no. 1). Puisque notre étude ne portait pas sur l'étude précise du rôle des auto-anticorps dans la ScS, nous n'avons pas étudié l'effet des anti-topo sur la physiologie du fibroblaste en présence de topo. Toutefois, il serait maintenant très intéressant de vérifier si les effets cellulaires induits par la topo sur le fibroblaste (article no. 1), probablement par l'entremise du CCR7, sont influencés par la présence des anti-topo.

Bien que l'implication des anti-topo dans la pathogenèse de la ScS ne soit pas encore bien établie, plusieurs études soutiennent tout de même ce concept. À titre

d'exemple, l'observation d'une importante fibrose cutanée est associée à des titres élevés d'anti-topo (59, 196) et ces titres s'élèvent lorsque la fibrose est active (196). Le développement d'une fibrose pulmonaire est fortement associé à la présence d'anti-topo chez les patients sclérodermiques (65). Encore ici, une association entre des titres élevés d'anti-topo et le développement de fibrose pulmonaire a été démontrée (59). Finalement, la résorption des anti-topo est associée à une amélioration de la fonction pulmonaire et de la survie de ces patients (197).

Somme toute, ces études cliniques appuient un rôle pathogène pour les anti-topo dans la ScS. Dans notre modèle, la présence d'anti-topo amplifierait la liaison de la topo aux HSPG à la surface des fibroblastes et contribuerait au développement d'un contexte inflammatoire suite au recrutement et à l'activation de cellules monocytaires. L'amplification du contexte inflammatoire serait propice à l'installation d'une fibrose caractéristique de la ScS (Figure 5).

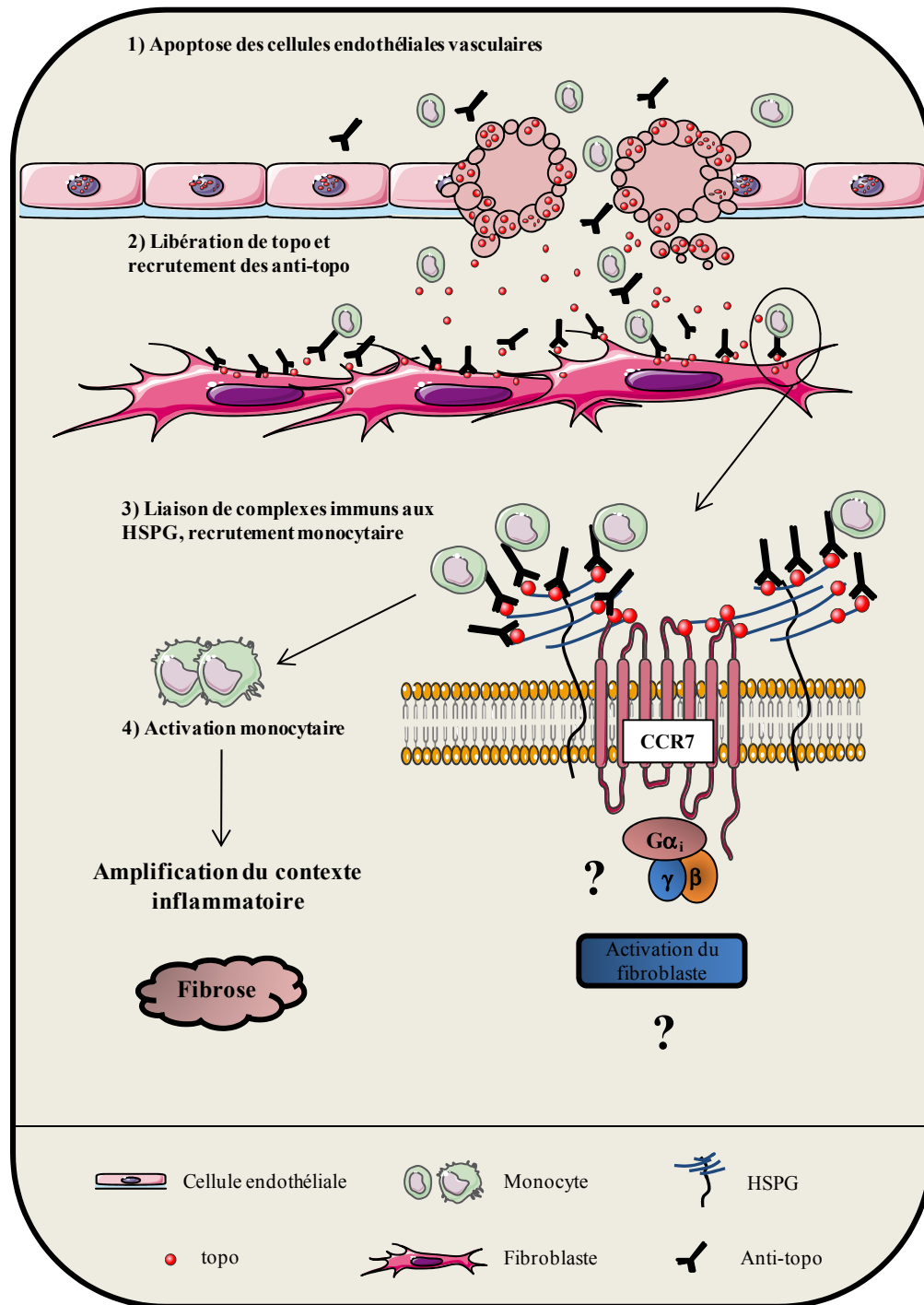


Figure 5. Modèle proposé pour l'effet pathogène des anti-topo dans la sclérose systémique.

Cibler la liaison du complexe immunitopo/anti-topo comme approche thérapeutique

Nos résultats soutiennent que la présence d'anti-topo amplifie la liaison de la topo et contribue au développement d'un contexte inflammatoire et pro-fibrotique. Selon nos résultats, les HSPG présents à la surface du fibroblaste sont la cible du complexe immunitopo/anti-topo. En effet, nous avons démontré que la perte des HS à la surface du fibroblaste ne permet pas la liaison du complexe immunitopo/anti-topo à la surface des fibroblastes (article no. 2, Figure 3). Ce résultat suggère donc que d'interférer avec la liaison du complexe immunitopo/anti-topo au niveau des HSPG pourrait être une approche thérapeutique potentielle contre l'initiation d'une cascade inflammatoire.

Puisque les chaînes HS sont des GAG analogues à l'héparine et que la topo lie celle-ci (382, 383), il devenait intéressant de l'utiliser pour interférer avec la liaison du complexe immunitopo/anti-topo à la surface du fibroblaste. Ainsi, l'héparine non fractionnée (HNF), des héparines de bas poids moléculaires (HBPM) et une héparine synthétique ont été utilisées dans nos essais. D'abord, un prétraitement de la topo avec l'héparine a permis de confirmer son interférence avec la liaison de la topo à la surface du fibroblaste, voire avec les HSPG (article no. 2, Figure 4A et annexe, Figure A2). Nous avons démontré que l'HNF et 2 HBPM, soit la daltéparine et l'énoxaparine, entraînent une inhibition dose-dépendante de la liaison de la topo à la surface du fibroblaste. Toutefois, le fondaparinux, une molécule pentasaccharidique de nature synthétique, n'affecte pas la liaison de la topo aux doses évaluées (annexe, Figure A2). Par ailleurs, les doses d'héparines utilisées dans nos essais se retrouvent légèrement supérieures aux doses thérapeutiques utilisées dans le traitement prophylactique des thromboses/thromboembolies (390). Le but de l'utilisation de l'héparine dans notre modèle demeurerait d'interférer avec la liaison du complexe immunitopo/anti-topo à la surface du fibroblaste pour cibler le développement d'une cascade inflammatoire. Ainsi, les héparines furent ajoutées simultanément aux complexes immunitopo/anti-topo sur les cellules. Nos résultats ont démontré une inhibition dose-dépendante de la liaison de la topo à la surface cellulaire à la fois pour l'HNF, la daltéparine et l'énoxaparine. Ici

encore, le fondaparinux n'affecte pas la liaison de la topo à la surface cellulaire (article no. 2, Figure 4B, C).

Comme nous l'avons vu, la ScS est une maladie très hétérogène ce qui complique souvent son diagnostic et il s'avère que plusieurs manifestations cliniques sont déjà présentes lors de la prise en charge du patient. Ainsi, il devenait intéressant d'évaluer la possibilité de dissocier le complexe immunitaire topo/anti-topo lié à la surface du fibroblaste. À la lumière de nos résultats, il est en effet possible de dissocier le complexe immunitaire lié à la surface des fibroblastes à l'aide de l'HNF, la daltéparine et l'énoxaparine. Encore ici, le fondaparinux n'exerce pas d'effet sur la dissociation du complexe immunitaire topo/anti-topo de la surface cellulaire (article no. 2, Figure 5). Ainsi, nos résultats démontrent qu'il est possible d'interférer avec le développement d'un contexte inflammatoire de façon préventive mais aussi après que certaines manifestations pathologiques se soient installées.

Puisque les différentes héparines utilisées se différencient majoritairement par la composition de leur chaîne de GAG, il est possible d'expliquer ces résultats par le fait que le fondaparinux, étant composé d'une séquence pentasaccharidique, ne contient pas la séquence nécessaire pour interférer avec la liaison de la topo et du complexe immunitaire topo/anti-topo aux HSPG. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que l'utilisation de l'HNF ainsi que de certaines HBPM pourrait prévenir la liaison du complexe immunitaire topo/anti-topo à la surface des fibroblastes mais que le fondaparinux est une molécule inactive dans notre modèle.

Finalement, la seconde partie de notre étude (article no. 2) a permis de suggérer un modèle pathophysiologique impliquant les anti-topo dans la ScS et de proposer une approche thérapeutique pour le contrer (Figure 6). Néanmoins, cette hypothèse doit être confirmée dans des modèles plus physiologiques.

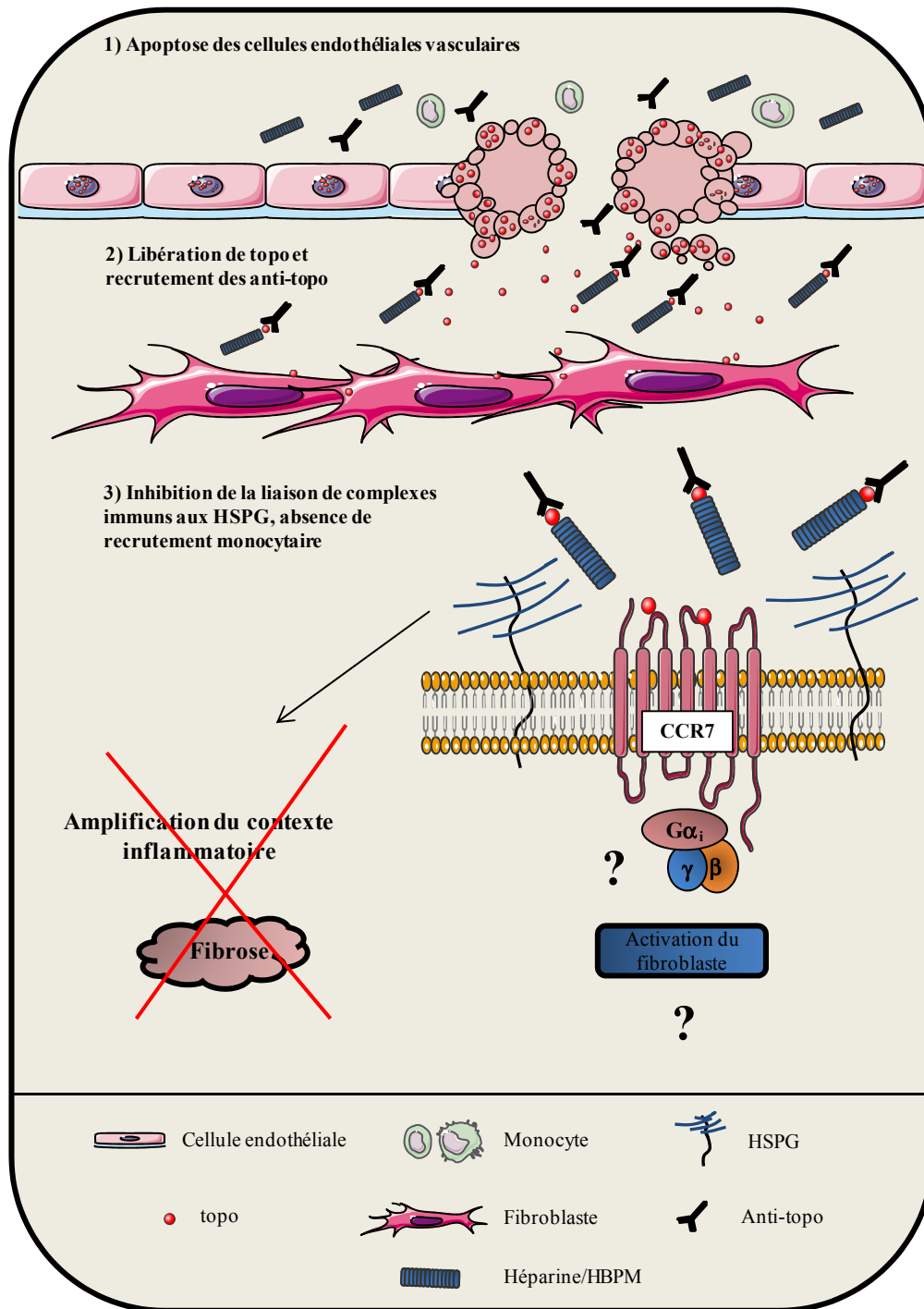


Figure 6. Effet de l'héparine non-fractionnée et des héparines de bas poids moléculaires dans la pathophysiologie de la sclérose systémique.

Vérification du rôle de la topo et du complexe topo/anti-topo dans des modèles physiologiques

Les résultats de notre étude permettent d'ajouter la topo à la liste des auto-antigènes bifonctionnels, c'est-à-dire capables d'influencer la physiologie du fibroblaste et ce, en participant à la fonction normale de réparation de blessure. Ces fonctions extracellulaires semblent être dépendantes de l'activation du CCR7. La topo utilise également les HSPG, présents en surface du fibroblaste à titre de corécepteurs et, en présence d'anti-topo, la liaison de la topo est amplifiée. L'ensemble de nos résultats furent obtenus en laboratoire avec des techniques *in vitro* sur des cultures primaires de fibroblastes humains du derme. Il paraît évident que des expériences plus représentatives de la complexité du modèle pathophysiologique que nous proposons devront être réalisées pour le confirmer.

D'abord, le rôle extracellulaire de la topo pourrait être étudié dans un modèle tissulaire tridimensionnel. En effet, des modèles de peau humaine reconstituée par génie tissulaire sont disponibles (391) et offriraient la possibilité de suivre la topo exogène, en la couplant avec un fluorochrome, dans un contexte de réparation de blessure. Également, dans un modèle de reconstitution vasculaire (392), la topo endogène libérée suite à une blessure endothéliale pourrait être étudiée. Dans ce modèle, l'origine de la topo mimerait son origine physiologique, soit l'apoptose des cellules endothéliales (13).

Nous avons démontré que la présence d'anti-topo amplifie la liaison de la topo au niveau des HSPG à la surface du fibroblaste. La liaison du complexe immunitaire topo/anti-topo entraîne le recrutement monocytaire et possiblement d'autres types cellulaires permettant l'installation d'un contexte inflammatoire et pro-fibrotique au site de la blessure vasculaire. Une boucle d'amplification de ces comportements est très suggestive d'un rôle pathogène pour les anti-topo. Pour confirmer notre hypothèse, il serait d'abord possible d'introduire des complexes immunitaires topo/anti-topo dans un modèle de peau reconstituée pour évaluer le recrutement monocytaire accompagné du développement d'un contexte inflammatoire pro-fibrotique. Au niveau des patients sclérodermiques, notre hypothèse serait également grandement soutenue par la détection d'anti-topo au niveau des lésions sclérodermiques. Le

transfert passif est également une méthode pour évaluer le rôle pathogène d'un anticorps. Cette technique consiste en l'injection de l'anticorps dans un hôte et d'y observer le développement du phénotype associé à la maladie. De toute évidence, des modèles animaux sont nécessaires pour cette technique. Au niveau de la ScS, peu de modèles animaux produisant des anti-topo sont disponibles (voir section 2.5). On retrouve des anti-topo dans les modèles murins TSK-1 et 2. Toutefois, la présence de ces auto-anticorps n'est pas associée à un phénotype distinctif de ScS comme c'est le cas chez l'humain ou n'est pas exclusive d'autres auto-anticorps. Ainsi, des différences concernant l'aspect immunitaire de la pathogenèse de la ScS semblent être présentes entre les modèles murins disponibles et l'humain et font en sorte que l'étude de la pathogénicité des anti-topo dans ces modèles s'avère inadéquate. Par contre, une autre façon d'étudier la pathogénicité des auto-anticorps demeure le retrait sélectif de ceux-ci par immuno-adsorption. Dans le cadre de notre modèle, cette technique consisterait à dépler de façon spécifique les anti-topo présents dans la circulation des patients en utilisant la topo comme agent adsorbant. De façon intéressante, cette technique a été utilisée pour le traitement de maladies auto-immunes telles que la myasthénie grave (393) et la cardiomyopathie dilatée idiopathique (394) et s'est avérée prometteuse. En effet, le retrait sélectif de certains auto-anticorps fut associé à une amélioration de l'état du patient (393, 394). Or, l'observation d'une diminution de la fibrose suite à une déplétion sélective des anti-topo démontrerait leur implication dans la pathogenèse de la ScS. D'ailleurs, dans nos expériences *in vitro*, la déplétion des anti-topo a permis d'obtenir des résultats concluants quant à leur participation dans notre modèle pathophysiologique pour la ScS (article no. 2, Figure 2). Néanmoins, l'identification des HSPG à titre de cible membranaire pour le complexe immun topo/anti-topo ouvre la porte à des approches thérapeutiques très intéressantes.

Évaluation de l'héparine à titre d'agent thérapeutique dans la sclérose systémique

Les résultats présentés dans la seconde partie de l'étude (article no. 2) démontrent que l'héparine entraîne une diminution de la liaison du complexe immuno topo/anti-topo à la surface des fibroblastes responsables du recrutement monocytaire et possiblement de la boucle inflammatoire propice au développement d'une fibrose, caractéristique de la ScS. Encore une fois, l'ensemble des résultats ont été obtenus à partir d'expérimentations *in vitro*. Suite à la confirmation de notre modèle pathophysiologique dû à la présence d'anti-topo dans un modèle plus physiologique tel que les tissus reconstruits par génie tissulaire, l'évaluation de l'effet de l'héparine dans ce modèle deviendrait prioritaire pour confirmer nos résultats. L'héparine a d'ailleurs déjà démontré des effets bénéfiques dans des modèles *in vivo* de maladies auto-immunes impliquant la présence de complexes immuns pathogènes telles que le LED (371, 372, 395).

D'autre part, nous avons démontré que la topo influence la physiologie des fibroblastes. L'évaluation des effets cellulaires médiés par la topo en présence d'héparine devrait également faire l'objet d'études supplémentaires.

Pour conclure, il est évident que l'évaluation de l'effet de l'héparine dans un modèle plus physiologique représentant notre hypothèse pathophysiologique permettrait d'obtenir des résultats préliminaires à titre d'agent thérapeutique prometteur pour la ScS.

Conclusion et perspectives

La thèse présentée ici avait pour but principal la caractérisation de l'interaction de l'auto-antigène topo avec les fibroblastes, cellules impliquées dans le processus fibrotique. D'abord, nos résultats suggèrent que la topo possède un corécepteur, les HSPG, permettant de se lier spécifiquement à la surface des fibroblastes ce qui lui permet ensuite d'interagir avec le CCR7. L'interaction de la topo avec la surface du fibroblaste a permis de confirmer que la topo possède des fonctions additionnelles une fois relâchée dans le milieu extracellulaire. En effet, ces fonctions influencent la physiologie du fibroblaste et nos résultats suggèrent fortement qu'elles s'effectuent suite à l'activation du CCR7. Ainsi, la topo pourrait participer au mécanisme de réparation de blessure suite à sa libération dans l'environnement extracellulaire par l'entremise du fibroblaste et par conséquent s'ajouter à la liste des auto-antigènes bifonctionnels.

Des études concernant le pouvoir pathogène des anti-topo ont préalablement fait l'objet de publication par notre groupe. Il a été conclu que la liaison du complexe immun topo/anti-topo à la surface du fibroblaste entraînait le recrutement monocytaire pouvant contribuer au développement de la ScS (13, 282). Suite à la caractérisation de l'interaction de la topo avec le fibroblaste, il a été possible de démontrer que cette liaison était dépendante de la présence des HSPG à la surface des fibroblastes, ce qui permettait l'amplification de la liaison de la topo. Celle-ci serait associée au développement du processus inflammatoire et pro-fibrotique. Ainsi, l'utilisation de molécules thérapeutiques ciblant cette interaction représente des approches prometteuses pour d'éventuelles thérapies pour les patients atteints de ScS diffuse avec anti-topo. Puisque la ScS est une maladie incurable, les résultats de notre étude sont d'autant plus stimulants pour tenter de prévenir, ralentir ou inhiber sa progression.

Bien que notre étude ait permis de répondre à certaines questions concernant le rôle de l'interaction de l'auto-antigène topo avec les fibroblastes dans la ScS, elle en soulève autant pour d'éventuelles recherches. Il est donc primordial de se questionner sur les points suivants :

- Quel est le domaine exact de liaison de la topo avec les chaînes d'héparanes sulfates et avec le CCR7?
- La topo peut-elle influencer d'autres populations cellulaires par l'entremise du CCR7?
- Quels sont les rôles des anti-topo sur les fonctions extracellulaires de la topo?
- Est-ce que l'héparine influence les fonctions extracellulaires de la topo? Si oui, quel en serait l'effet?
- L'effet pathogène des anti-topo peut-il être démontré dans un modèle *in vivo*? Quel est l'effet de l'héparine dans ce modèle?

Somme toute, notre étude soutient d'abord le rôle de l'auto-antigène topo à titre de molécule bifonctionnelle mais, en second lieu, celui du rôle pathogène des anti-topo dans la ScS par l'entremise de l'interaction de sa cible, la topo, avec les HSPG présents à la surface des fibroblastes. Ainsi, la liaison du complexe immunitaire topo/anti-topo représente un élément clé pouvant être ciblé pour tenter d'inhiber le développement de la fibrose, caractéristique de la ScS.

Bibliographie

1. Jimenez SA, Derk CT. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med.* 2004;140(1):37-50.
2. Varga J. Systemic sclerosis: an update. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2008;66(3):198-202.
3. Mihai C, Tervaert JW. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(2):319-24.
4. Robitaille G, Christin MS, Clement I, Senecal JL, Raymond Y. Nuclear autoantigen CENP-B transactivation of the epidermal growth factor receptor via chemokine receptor 3 in vascular smooth muscle cells. *Arthritis Rheum.* 2009;60(9):2805-16.
5. Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, Testoni C, Mallone R, Gabrielli A, et al. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2002;46(6):1602-13.
6. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;354(25):2667-76.
7. Arnett FC, Tan FK, Uziel Y, Laxer RM, Krafchik BR, Antohi S, et al. Autoantibodies to the extracellular matrix microfibrillar protein, fibrillin 1, in patients with localized scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1999;42(12):2656-9.
8. Howard OM, Dong HF, Yang D, Raben N, Nagaraju K, Rosen A, et al. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J Exp Med.* 2002;196(6):781-91.
9. Robitaille G, Henault J, Christin MS, Senecal JL, Raymond Y. The nuclear autoantigen CENP-B displays cytokine-like activities toward vascular smooth muscle cells. *Arthritis Rheum.* 2007;56(11):3814-26.
10. Oppenheim JJ, Dong HF, Plotz P, Caspi RR, Dykstra M, Pierce S, et al. Autoantigens act as tissue-specific chemoattractants. *J Leukoc Biol.* 2005;77(6):854-61.
11. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol.* 2005;78(1):1-8.

12. Steen VD, Medsger TA, Jr. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2000;43(11):2437-44.
13. Henault J, Robitaille G, Senecal JL, Raymond Y. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum.* 2006;54(3):963-73.
14. Goodnow CC, Vinuesa CG, Randall KL, Mackay F, Brink R. Control systems and decision making for antibody production. *Nat Immunol.* 2010;11(8):681-8.
15. Halverson R, Torres RM, Pelanda R. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat Immunol.* 2004;5(6):645-50.
16. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:305-34.
17. Sakaguchi S, Sakaguchi N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int Rev Immunol.* 2005;24(3-4):211-26.
18. Langier S, Sade K, Kivity S. Regulatory T cells: The suppressor arm of the immune system. *Autoimmun Rev.* 2010.
19. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2010;11(1):7-13.
20. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002;296(5566):301-5.
21. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2001;13(1):114-9.
22. Tveita AA. The danger model in deciphering autoimmunity. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49(4):632-9.
23. Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2003;2(3):119-25.
24. Youinou P, Pers JO, Gershwin ME, Shoenfeld Y. Geo-epidemiology and autoimmunity. *J Autoimmun.* 2010;34(3):J163-7.
25. Lleo A, Invernizzi P, Gao B, Podda M, Gershwin ME. Definition of human autoimmunity--autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 2010;9(5):A259-66.

26. Serrano NC, Millan P, Paez MC. Non-HLA associations with autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2006;5(3):209-14.
27. Gregersen PK, Behrens TW. Genetics of autoimmune diseases--disorders of immune homeostasis. *Nat Rev Genet.* 2006;7(12):917-28.
28. Fernandez-Blanco L, Perez-Pampin E, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. A CTLA-4 polymorphism associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004;50(1):328-9.
29. Michou L, Lasbleiz S, Rat AC, Migliorini P, Balsa A, Westhovens R, et al. Linkage proof for PTPN22, a rheumatoid arthritis susceptibility gene and a human autoimmunity gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(5):1649-54.
30. Balada E, Villarreal-Tolchinsky J, Ordi-Ros J, Labrador M, Serrano-Acedo S, Martinez-Lostao L, et al. Multiplex family-based study in systemic lupus erythematosus: association between the R620W polymorphism of PTPN22 and the FcγRIIa (CD32A) R131 allele. *Tissue Antigens.* 2006;68(5):432-8.
31. Ramsdell F, Ziegler SF. Transcription factors in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2003;15(6):718-24.
32. Nomura T, Sakaguchi S. Foxp3 and Aire in thymus-generated Treg cells: a link in self-tolerance. *Nat Immunol.* 2007;8(4):333-4.
33. Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem.* 2001;276(40):37672-9.
34. Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, et al. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1713-22.
35. Holzelova E, Vonarbourg C, Stolzenberg MC, Arkwright PD, Selz F, Prieur AM, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N Engl J Med.* 2004;351(14):1409-18.
36. Turbyville JC, Rao VK. The autoimmune lymphoproliferative syndrome: A rare disorder providing clues about normal tolerance. *Autoimmun Rev.* 2010;9(7):488-93.

37. Alarcon-Segovia D, Alarcon-Riquelme ME, Cardiel MH, Caeiro F, Massardo L, Villa AR, et al. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis Rheum.* 2005;52(4):1138-47.
38. Hewagama A, Richardson B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2009;33(1):3-11.
39. Kivity S, Agmon-Levin N, Blank M, Shoenfeld Y. Infections and autoimmunity--friends or foes? *Trends Immunol.* 2009;30(8):409-14.
40. Toussiro E, Wendling D, Tiberghien P, Luka J, Roudier J. Decreased T cell precursor frequencies to Epstein-Barr virus glycoprotein Gp110 in peripheral blood correlate with disease activity and severity in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(7):533-8.
41. Grossman C, Dovrish Z, Shoenfeld Y, Amital H. Do infections facilitate the emergence of systemic sclerosis? *Autoimmun Rev.* 2010.
42. Toussiro E, Roudier J. Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22(5):883-96.
43. Nietert PJ, Silver RM. Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors. *Curr Opin Rheumatol.* 2000;12(6):520-6.
44. Ranque B, Mouthon L. Geoepidemiology of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2010;9(5):A311-8.
45. Englert H, Small-McMahon J, Davis K, O'Connor H, Chambers P, Brooks P. Male systemic sclerosis and occupational silica exposure-a population-based study. *Aust N Z J Med.* 2000;30(2):215-20.
46. Diot E, Lesire V, Guilmot JL, Metzger MD, Pilore R, Rogier S, et al. Systemic sclerosis and occupational risk factors: a case-control study. *Occup Environ Med.* 2002;59(8):545-9.
47. Cornacchia E, Golbus J, Maybaum J, Strahler J, Hanash S, Richardson B. Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity. *J Immunol.* 1988;140(7):2197-200.

48. Pollard KM, Hultman P, Kono DH. Toxicology of autoimmune diseases. *Chem Res Toxicol*. 2010;23(3):455-66.
49. Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Munoz S, Soria N, Galiana D, Bertolaccini L, et al. Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies: analysis of 233 cases. *Medicine (Baltimore)*. 2007;86(4):242-51.
50. Vedove CD, Del Giglio M, Schena D, Girolomoni G. Drug-induced lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res*. 2009;301(1):99-105.
51. Goetz RH. Pathology of progressive systemic sclerosis (generalized scleroderma) with special reference to changes in the viscera. *Clin Proc (S Africa)*. 1945;4:337-42.
52. Merkel PA, Herlyn K, Martin RW, Anderson JJ, Mayes MD, Bell P, et al. Measuring disease activity and functional status in patients with scleroderma and Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum*. 2002;46(9):2410-20.
53. Vincent C, Agard C, Barbarot S, N'Guyen J M, Planchon B, Durant C, et al. [Orofacial manifestations of systemic sclerosis: A study of 30 consecutive patients]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 2010;111(3):128-34.
54. Ferri C, Valentini G, Cozzi F, Sebastiani M, Michelassi C, La Montagna G, et al. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. *Medicine (Baltimore)*. 2002;81(2):139-53.
55. Scussel-Lonzetti L, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Rich E, Goulet JR, et al. Predicting mortality in systemic sclerosis: analysis of a cohort of 309 French Canadian patients with emphasis on features at diagnosis as predictive factors for survival. *Medicine (Baltimore)*. 2002;81(2):154-67.
56. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis and Rheumatism*. 1980;23:581-90
57. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr., et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988;15(2):202-5.

58. LeRoy EC, Medsger TA, Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2001;28(7):1573-6.
59. Diot E, Giraudeau B, Diot P, Degenne D, Ritz L, Guilmot JL, et al. Is anti-topoisomerase I a serum marker of pulmonary involvement in systemic sclerosis? *Chest*. 1999;116(3):715-20.
60. Steen VD, Powell DL, Medsger TA, Jr. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1988;31(2):196-203.
61. Miller MH, Littlejohn GO, Davidson A, Jones B, Topliss DJ. The clinical significance of the anticentromere antibody. *Br J Rheumatol*. 1987;26(1):17-21.
62. Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(2):80-93.
63. Kallenberg CG, Wouda AA, Hoet MH, van Venrooij WJ. Development of connective tissue disease in patients presenting with Raynaud's phenomenon: a six year follow up with emphasis on the predictive value of antinuclear antibodies as detected by immunoblotting. *Ann Rheum Dis*. 1988;47(8):634-41.
64. Koenig M, Joyal F, Fritzler MJ, Roussin A, Abrahamowicz M, Boire G, et al. Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: a twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(12):3902-12.
65. Hesselstrand R, Scheja A, Shen GQ, Wiik A, Akesson A. The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2003;42(4):534-40.
66. Spencer-Green G, Alter D, Welch HG. Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl-70 antibodies. *Am J Med*. 1997;103(3):242-8.
67. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum*. 2005;35(1):35-42.

68. Karassa FB, Ioannidis JP. Mortality in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26(5 Suppl 51):S85-93.
69. Roberts-Thomson PJ, Jones M, Hakendorf P, Kencana Dharmapatni AA, Walker JG, MacFarlane JG, et al. Scleroderma in South Australia: epidemiological observations of possible pathogenic significance. *Intern Med J*. 2001;31(4):220-9.
70. Barnett AJ, Miller MH, Littlejohn GO. A survival study of patients with scleroderma diagnosed over 30 years (1953-1983): the value of a simple cutaneous classification in the early stages of the disease. *J Rheumatol*. 1988;15(2):276-83.
71. Robinson D, Jr., Eisenberg D, Nietert PJ, Doyle M, Bala M, Paramore C, et al. Systemic sclerosis prevalence and comorbidities in the US, 2001-2002. *Curr Med Res Opin*. 2008;24(4):1157-66.
72. Bernatsky S, Joseph L, Pineau CA, Belisle P, Hudson M, Clarke AE. Scleroderma prevalence: demographic variations in a population-based sample. *Arthritis Rheum*. 2009;61(3):400-4.
73. Mayes MD, Lacey JV, Jr., Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum*. 2003;48(8):2246-55.
74. Nietert PJ, Mitchell HC, Bolster MB, Shaftman SR, Tilley BC, Silver RM. Racial variation in clinical and immunological manifestations of systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2006;33(2):263-8.
75. Laing TJ, Gillespie BW, Toth MB, Mayes MD, Gallavan RH, Jr., Burns CJ, et al. Racial differences in scleroderma among women in Michigan. *Arthritis Rheum*. 1997;40(4):734-42.
76. Arnett FC, Howard RF, Tan F, Moulds JM, Bias WB, Durban E, et al. Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis Rheum*. 1996;39(8):1362-70.
77. Tamaki T, Mori S, Takehara K. Epidemiological study of patients with systemic sclerosis in Tokyo. *Arch Dermatol Res*. 1991;283(6):366-71.

78. Steen VD, Oddis CV, Conte CG, Janoski J, Casterline GZ, Medsger TA, Jr. Incidence of systemic sclerosis in Allegheny County, Pennsylvania. A twenty-year study of hospital-diagnosed cases, 1963-1982. *Arthritis Rheum.* 1997;40(3):441-5.
79. Englert H, Small-McMahon J, Davis K, O'Connor H, Chambers P, Brooks P. Systemic sclerosis prevalence and mortality in Sydney 1974-88. *Aust N Z J Med.* 1999;29(1):42-50.
80. Chiffhot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum.* 2008;37(4):223-35.
81. Ansell BM, Nasseh GA, Bywaters EG. Scleroderma in childhood. *Ann Rheum Dis.* 1976;35(3):189-97.
82. Czirjak L, Nagy Z, Szegedi G. Systemic sclerosis in the elderly. *Clin Rheumatol.* 1992;11(4):483-5.
83. Perez-Bocanegra C, Solans-Laqué R, Simeon-Aznar CP, Campillo M, Fonollosa-Pla V, Vilardell-Tarres M. Age-related survival and clinical features in systemic sclerosis patients older or younger than 65 at diagnosis. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49(6):1112-7.
84. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum.* 2001;44(6):1359-62.
85. Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Jr., Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* 2003;48(7):1956-63.
86. Zhou X, Tan FK, Xiong M, Arnett FC, Feghali-Bostwick CA. Monozygotic twins clinically discordant for scleroderma show concordance for fibroblast gene expression profiles. *Arthritis Rheum.* 2005;52(10):3305-14.
87. Gilchrist FC, Bunn C, Foley PJ, Lympny PA, Black CM, Welsh KI, et al. Class II HLA associations with autoantibodies in scleroderma: a highly significant role for HLA-DP. *Genes Immun.* 2001;2(2):76-81.

88. Nguyen B, Mayes MD, Arnett FC, Del Junco D, Reveille JD, Gonzalez EB, et al. HLA-DRB1*0407 and *1304 are risk factors for scleroderma renal crisis. *Arthritis Rheum.* 2010.
89. Jazwinska EC, Olive C, Dunckley H, Naito S, Kuseba T, Serjeantson SW. HLA-DRw15 is increased in frequency in Japanese scleroderma patients. *Dis Markers.* 1990;8(6):323-6.
90. Lambert NC, Distler O, Muller-Ladner U, Tylee TS, Furst DE, Nelson JL. HLA-DQA1*0501 is associated with diffuse systemic sclerosis in Caucasian men. *Arthritis Rheum.* 2000;43(9):2005-10.
91. Crilly A, Hamilton J, Clark CJ, Jardine A, Madhok R. Analysis of transforming growth factor beta1 gene polymorphisms in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(8):678-81.
92. Susol E, Rands AL, Herrick A, McHugh N, Barrett JH, Ollier WE, et al. Association of markers for TGFbeta3, TGFbeta2 and TIMP1 with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2000;39(12):1332-6.
93. Tan FK, Wang N, Kuwana M, Chakraborty R, Bona CA, Milewicz DM, et al. Association of fibrillin 1 single-nucleotide polymorphism haplotypes with systemic sclerosis in Choctaw and Japanese populations. *Arthritis Rheum.* 2001;44(4):893-901.
94. Tan FK, Stivers DN, Foster MW, Chakraborty R, Howard RF, Milewicz DM, et al. Association of microsatellite markers near the fibrillin 1 gene on human chromosome 15q with scleroderma in a Native American population. *Arthritis Rheum.* 1998;41(10):1729-37.
95. Zhou X, Tan FK, Reveille JD, Wallis D, Milewicz DM, Ahn C, et al. Association of novel polymorphisms with the expression of SPARC in normal fibroblasts and with susceptibility to scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2002;46(11):2990-9.
96. Bovenzi M, Barbone F, Betta A, Tommasini M, Versini W. Scleroderma and occupational exposure. *Scand J Work Environ Health.* 1995;21(4):289-92.
97. Beyer C, Schett G, Distler O, Distler JH. Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum.* 2010;62(10):2831-44.

98. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol.* 1999;112(4):456-62.
99. Claman HN, Jaffee BD, Huff JC, Clark RA. Chronic graft-versus-host disease as a model for scleroderma. II. Mast cell depletion with deposition of immunoglobulins in the skin and fibrosis. *Cell Immunol.* 1985;94(1):73-84.
100. Jaffee BD, Claman HN. Chronic graft-versus-host disease (GVHD) as a model for scleroderma. I. Description of model systems. *Cell Immunol.* 1983;77(1):1-12.
101. Ruzek MC, Jha S, Ledbetter S, Richards SM, Garman RD. A modified model of graft-versus-host-induced systemic sclerosis (scleroderma) exhibits all major aspects of the human disease. *Arthritis Rheum.* 2004;50(4):1319-31.
102. Siracusa LD, McGrath R, Ma Q, Moskow JJ, Manne J, Christner PJ, et al. A tandem duplication within the fibrillin 1 gene is associated with the mouse tight skin mutation. *Genome Res.* 1996;6(4):300-13.
103. Hatakeyama A, Kasturi KN, Wolf I, Phelps RG, Bona CA. Correlation between the concentration of serum anti-topoisomerase I autoantibodies and histological and biochemical alterations in the skin of tight skin mice. *Cell Immunol.* 1996;167(1):135-40.
104. Bocchieri MH, Henriksen PD, Kasturi KN, Muryoi T, Bona CA, Jimenez SA. Evidence for autoimmunity in the tight skin mouse model of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1991;34(5):599-605.
105. Christner PJ, Peters J, Hawkins D, Siracusa LD, Jimenez SA. The tight skin 2 mouse. An animal model of scleroderma displaying cutaneous fibrosis and mononuclear cell infiltration. *Arthritis Rheum.* 1995;38(12):1791-8.
106. Gentiletti J, McCloskey LJ, Artlett CM, Peters J, Jimenez SA, Christner PJ. Demonstration of autoimmunity in the tight skin-2 mouse: a model for scleroderma. *J Immunol.* 2005;175(4):2418-26.
107. Gershwin ME, Abplanalp H, Castles JJ, Ikeda RM, van der Water J, Eklund J, et al. Characterization of a spontaneous disease of white leghorn chickens resembling progressive systemic sclerosis (scleroderma). *J Exp Med.* 1981;153(6):1640-59.

108. Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, Recheis H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest.* 1996;98(3):785-92.
109. Gruschwitz MS, Shoenfeld Y, Krupp M, Gershwin ME, Penner E, Brezinschek HP, et al. Antinuclear antibody profile in UCD line 200 chickens: a model for progressive systemic sclerosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1993;100(4):307-13.
110. Tamby MC, Chanseaud Y, Guillevin L, Mouthon L. New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2003;2(3):152-7.
111. Wigley FM. Vascular disease in scleroderma. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2009;36(2-3):150-75.
112. Kahaleh MB, Osborn I, LeRoy EC. Increased factor VIII/von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor activity in scleroderma and in Raynaud's phenomenon. *Ann Intern Med.* 1981;94(4 pt 1):482-4.
113. Yamane K, Miyauchi T, Suzuki N, Yuhara T, Akama T, Suzuki H, et al. Significance of plasma endothelin-1 levels in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1992;19(10):1566-71.
114. Vancheeswaran R, Magoulas T, Efrat G, Wheeler-Jones C, Olsen I, Penny R, et al. Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis subsets--a marker of fibrosis or vascular dysfunction? *J Rheumatol.* 1994;21(10):1838-44.
115. Ohdama S, Takano S, Miyake S, Kubota T, Sato K, Aoki N. Plasma thrombomodulin as a marker of vascular injuries in collagen vascular diseases. *Am J Clin Pathol.* 1994;101(1):109-13.
116. Carvalho D, Savage CO, Black CM, Pearson JD. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J Clin Invest.* 1996;97(1):111-9.
117. Marks RM, Czerniecki M, Andrews BS, Penny R. The effects of scleroderma serum on human microvascular endothelial cells. Induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Arthritis Rheum.* 1988;31(12):1524-34.

118. Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, Wick G. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis Rheum.* 2000;43(11):2550-62.
119. Kahaleh MB, Fan PS. Mechanism of serum-mediated endothelial injury in scleroderma: identification of a granular enzyme in scleroderma skin and sera. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997;83(1):32-40.
120. Distler O, Distler JH, Scheid A, Acker T, Hirth A, Rethage J, et al. Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res.* 2004;95(1):109-16.
121. Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet.* 2004;364(9434):603-10.
122. Distler JH, Gay S, Distler O. Angiogenesis and vasculogenesis in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45 Suppl 3:iii26-7.
123. Kahaleh MB. Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action. *Arthritis Rheum.* 1991;34(8):978-83.
124. Xu S, Denton CP, Holmes A, Dashwood MR, Abraham DJ, Black CM. Endothelins: effect on matrix biosynthesis and proliferation in normal and scleroderma fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31 Suppl 1:S360-3.
125. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 1996;183(6):2593-603.
126. Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AM, Langelier Y, et al. Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *J Immunol.* 2005;174(9):5740-9.
127. Fleischmajer R, Perlish JS, Reeves JR. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis Rheum.* 1977;20(4):975-84.
128. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA, Jr., Rodnan GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum.* 1984;27(6):645-53.

129. Kraling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology*. 1995;63(1):48-56.
130. Ishikawa O, Ishikawa H. Macrophage infiltration in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1992;19(8):1202-6.
131. Wells AU, Lorimer S, Majumdar S, Harrison NK, Corrin B, Black CM, et al. Fibrosing alveolitis in systemic sclerosis: increase in memory T-cells in lung interstitium. *Eur Respir J*. 1995;8(2):266-71.
132. Freundlich B, Jimenez SA. Phenotype of peripheral blood lymphocytes in patients with progressive systemic sclerosis: activated T lymphocytes and the effect of D-penicillamine therapy. *Clin Exp Immunol*. 1987;69(2):375-84.
133. Sakkas LI, Xu B, Artlett CM, Lu S, Jimenez SA, Platsoucas CD. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Immunol*. 2002;168(7):3649-59.
134. Hu PQ, Oppenheim JJ, Medsger TA, Jr., Wright TM. T cell lines from systemic sclerosis patients and healthy controls recognize multiple epitopes on DNA topoisomerase I. *J Autoimmun*. 2006;26(4):258-67.
135. Sempowski GD, Derdak S, Phipps RP. Interleukin-4 and interferon-gamma discordantly regulate collagen biosynthesis by functionally distinct lung fibroblast subsets. *J Cell Physiol*. 1996;167(2):290-6.
136. Granstein RD, Murphy GF, Margolis RJ, Byrne MH, Amento EP. Gamma-interferon inhibits collagen synthesis in vivo in the mouse. *J Clin Invest*. 1987;79(4):1254-8.
137. Atamas SP, Yurovsky VV, Wise R, Wigley FM, Goter Robinson CJ, Henry P, et al. Production of type 2 cytokines by CD8⁺ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1999;42(6):1168-78.
138. Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghov R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest*. 1992;90(4):1479-85.

139. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1997;24(2):328-32.
140. Needleman BW, Wigley FM, Stair RW. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1992;35(1):67-72.
141. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(11):2455-63.
142. Hasegawa M, Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Kikuchi K, Takehara K. Serum levels of interleukin 6 (IL-6), oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1998;25(2):308-13.
143. Hasegawa M, Sato S, Ihn H, Takehara K. Enhanced production of interleukin-6 (IL-6), oncostatin M and soluble IL-6 receptor by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 1999;38(7):612-7.
144. Kaviratne M, Hesse M, Leusink M, Cheever AW, Davies SJ, McKerrow JH, et al. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *J Immunol.* 2004;173(6):4020-9.
145. Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol.* 2000;165(11):6635-43.
146. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum.* 2004;50(6):1918-27.
147. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol.* 1989;44:93-151.
148. Duncan MR, Berman B. Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *J Invest Dermatol.* 1991;97(4):686-92.

149. Sakkas LI, Chikanza IC, Platsoucas CD. Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2(12):679-85.
150. Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Koder M, Takehara K, Sato S. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum*. 2006;54(1):192-201.
151. Varga J, Bashey RI. Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol*. 1995;12(2-4):187-99.
152. Jinnin M. Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis. *J Dermatol*. 2010;37(1):11-25.
153. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*. 1993;122(1):103-11.
154. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, et al. Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol*. 1995;105(2):280-4.
155. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, et al. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol*. 2000;27(1):149-54.
156. Denton CP, Abraham DJ. Transforming growth factor-beta and connective tissue growth factor: key cytokines in scleroderma pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol*. 2001;13(6):505-11.
157. Leask A, Holmes A, Abraham DJ. Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2002;4(2):136-42.
158. Mori Y, Chen SJ, Varga J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2003;48(7):1964-78.

159. Piek E, Ju WJ, Heyer J, Escalante-Alcalde D, Stewart CL, Weinstein M, et al. Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001;276(23):19945-53.
160. Zhao J, Shi W, Wang YL, Chen H, Bringas P, Jr., Datto MB, et al. Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282(3):L585-93.
161. Dong C, Zhu S, Wang T, Yoon W, Li Z, Alvarez RJ, et al. Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(6):3908-13.
162. Czuwara-Ladykowska J, Sementchenko VI, Watson DK, Trojanowska M. Ets1 is an effector of the transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling pathway and an antagonist of the profibrotic effects of TGF-beta. *J Biol Chem*. 2002;277(23):20399-408.
163. Ihn H, Tamaki K. Increased phosphorylation of transcription factor Sp1 in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of the type I collagen gene. *Arthritis Rheum*. 2000;43(10):2240-7.
164. Luchetti MM, Paroncini P, Majlingova P, Frampton J, Mucenski M, Baroni SS, et al. Characterization of the c-Myb-responsive region and regulation of the human type I collagen alpha 2 chain gene by c-Myb. *J Biol Chem*. 2003;278(3):1533-41.
165. Piccinini G, Golay J, Flora A, Songia S, Luchetti M, Gabrielli A, et al. C-myb, but not B-myb, upregulates type I collagen gene expression in human fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 1999;112(2):191-6.
166. Piccinini G, Luchetti MM, Caniglia ML, Carossino AM, Montroni M, Introna M, et al. c-myb proto-oncogene is expressed by quiescent scleroderma fibroblasts and, unlike B-myb gene, does not correlate with proliferation. *J Invest Dermatol*. 1996;106(6):1281-6.
167. Bhattacharyya S, Ghosh AK, Pannu J, Mori Y, Takagawa S, Chen G, et al. Fibroblast expression of the coactivator p300 governs the intensity of profibrotic response to transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum*. 2005;52(4):1248-58.

168. Ihn H, Yamane K, Asano Y, Jinnin M, Tamaki K. Constitutively phosphorylated Smad3 interacts with Sp1 and p300 in scleroderma fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45(2):157-65.
169. Kuroda K, Shinkai H. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res*. 1997;289(10):567-72.
170. Kikuchi K, Kadono T, Furue M, Tamaki K. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 1997;108(3):281-4.
171. Takeda K, Hatamochi A, Ueki H, Nakata M, Oishi Y. Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 1994;103(3):359-63.
172. Chizzolini C, Rezzonico R, Ribbens C, Burger D, Wollheim FA, Dayer JM. Inhibition of type I collagen production by dermal fibroblasts upon contact with activated T cells: different sensitivity to inhibition between systemic sclerosis and control fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 1998;41(11):2039-47.
173. Jelaska A, Korn JH. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2000;43(10):2230-9.
174. Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev*. 1979;59(1):1-61.
175. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*. 2004;84(3):767-801.
176. Rothfield NF, Rodnan GP. Serum antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*. 1968;11(5):607-17.
177. Reveille JD, Solomon DH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum*. 2003;49(3):399-412.

178. Hachulla E, Dubucquoi S. [Nuclear auto-antibodies: a useful tool for the diagnosis, the classification and the prognosis of systemic sclerosis]. *Rev Med Interne*. 2004;25(6):442-7.
179. Koenig M, Dieude M, Senecal JL. Predictive value of antinuclear autoantibodies: the lessons of the systemic sclerosis autoantibodies. *Autoimmun Rev*. 2008;7(8):588-93.
180. Douvas AS, Achten M, Tan EM. Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J Biol Chem*. 1979;254(20):10514-22.
181. Shero JH, Bordwell B, Rothfield NF, Earnshaw WC. High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science*. 1986;231(4739):737-40.
182. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:369-413.
183. Redinbo MR, Stewart L, Kuhn P, Champoux JJ, Hol WG. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science*. 1998;279(5356):1504-13.
184. Alsner J, Svejstrup JQ, Kjeldsen E, Sorensen BS, Westergaard O. Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for in vivo function. *J Biol Chem*. 1992;267(18):12408-11.
185. Madden KR, Champoux JJ. Overexpression of human topoisomerase I in baby hamster kidney cells: hypersensitivity of clonal isolates to camptothecin. *Cancer Res*. 1992;52(3):525-32.
186. Stewart L, Ireton GC, Parker LH, Madden KR, Champoux JJ. Biochemical and biophysical analyses of recombinant forms of human topoisomerase I. *J Biol Chem*. 1996;271(13):7593-601.
187. Hildebrandt S, Weiner E, Senecal JL, Noell S, Daniels L, Earnshaw WC, et al. The IgG, IgM, and IgA isotypes of anti-topoisomerase I and anticentromere autoantibodies. *Arthritis Rheum*. 1990;33(5):724-7.

188. Piccinini G, Cardellini E, Reimer G, Arnett FC, Durban E. An antigenic region of topoisomerase I in DNA polymerase chain reaction-generated fragments recognized by autoantibodies of scleroderma patients. *Mol Immunol.* 1991;28(4-5):333-9.
189. Kuwana M, Kaburaki J, Medsger TA, Jr., Wright TM. An immunodominant epitope on DNA topoisomerase I is conformational in nature: heterogeneity in its recognition by systemic sclerosis sera. *Arthritis Rheum.* 1999;42(6):1179-88.
190. Kato T, Yamamoto K, Takeuchi H, Okubo M, Hara E, Nakada S, et al. Identification of a universal B cell epitope on DNA topoisomerase I, an autoantigen associated with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1993;36(11):1580-7.
191. D'Arpa P, White-Cooper H, Cleveland DW, Rothfield NF, Earnshaw WC. Use of molecular cloning methods to map the distribution of epitopes on topoisomerase I (Scl-70) recognized by sera of scleroderma patients. *Arthritis Rheum.* 1990;33(10):1501-11.
192. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA, Jr., Wright TM. Molecular recognition patterns of serum anti-DNA topoisomerase I antibody in systemic sclerosis. *J Immunol.* 2004;173(4):2834-41.
193. Mahler M, Silverman ED, Schulte-Pelkum J, Fritzler MJ. Anti-Scl-70 (topo-I) antibodies in SLE: Myth or reality? *Autoimmun Rev.* 2010;9(11):756-60.
194. Ferri C, Bernini L, Cecchetti R, Latorraca A, Marotta G, Pasero G, et al. Cutaneous and serologic subsets of systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1991;18(12):1826-32.
195. Arora-Singh RK, Assassi S, del Junco DJ, Arnett FC, Perry M, Irfan U, et al. Autoimmune diseases and autoantibodies in the first degree relatives of patients with systemic sclerosis. *J Autoimmun.* 2010;35(1):52-7.
196. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA, Jr., Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(5):1363-73.
197. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Kawakami Y, Tojo T. Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(5):1074-84.

198. Reveille JD, Fischbach M, McNearney T, Friedman AW, Aguilar MB, Lisse J, et al. Systemic sclerosis in 3 US ethnic groups: a comparison of clinical, sociodemographic, serologic, and immunogenetic determinants. *Semin Arthritis Rheum*. 2001;30(5):332-46.
199. Genth E, Mierau R, Genetzky P, von Muhlen CA, Kaufmann S, von Wilmowsky H, et al. Immunogenetic associations of scleroderma-related antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum*. 1990;33(5):657-65.
200. Reveille JD, Durban E, MacLeod-St Clair MJ, Goldstein R, Moreda R, Altman RD, et al. Association of amino acid sequences in the HLA-DQB1 first domain with antitopoisomerase I autoantibody response in scleroderma (progressive systemic sclerosis). *J Clin Invest*. 1992;90(3):973-80.
201. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Inoko H, Tsuji K. The HLA-DR and DQ genes control the autoimmune response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis (scleroderma). *J Clin Invest*. 1993;92(3):1296-301.
202. Earnshaw W, Bordwell B, Marino C, Rothfield N. Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera from patients with anti-centromere antibodies. *J Clin Invest*. 1986;77(2):426-30.
203. Earnshaw WC, Sullivan KF, Machlin PS, Cooke CA, Kaiser DA, Pollard TD, et al. Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the major human centromere autoantigen. *J Cell Biol*. 1987;104(4):817-29.
204. Okada T, Ohzeki J, Nakano M, Yoda K, Brinkley WR, Larionov V, et al. CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context. *Cell*. 2007;131(7):1287-300.
205. Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, Moroi Y, Fritzler MJ, Peebles C. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum*. 1980;23(6):617-25.
206. Verheijen R, de Jong BA, Obery EH, van Venrooij WJ. Molecular cloning of a major CENP-B epitope and its use for the detection of anticentromere autoantibodies. *Mol Biol Rep*. 1992;16(1):49-59.

207. Chan HL, Lee YS, Hong HS, Kuo TT. Anticentromere antibodies (ACA): clinical distribution and disease specificity. *Clin Exp Dermatol*. 1994;19(4):298-302.
208. Vazquez-Abad D, Grodzicky T, Senecal JL. Anticentromere autoantibodies in patients without Raynaud's disease or systemic sclerosis. *Clin Immunol*. 1999;90(2):182-9.
209. Vazquez-Abad D, Russell CA, Cusick SM, Earnshaw WC, Rothfield NF. Longitudinal study of anticentromere and antitopoisomerase-I isotypes. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995;74(3):257-70.
210. Tramposch HD, Smith CD, Senecal JL, Rothfield N. A long-term longitudinal study of anticentromere antibodies. *Arthritis Rheum*. 1984;27(2):121-4.
211. Sato H, Lagan AL, Alexopoulou C, Vassilakis DA, Ahmad T, Pantelidis P, et al. The TNF-863A allele strongly associates with anticentromere antibody positivity in scleroderma. *Arthritis Rheum*. 2004;50(2):558-64.
212. Dick T, Mierau R, Bartz-Bazzanella P, Alavi M, Stoyanova-Scholz M, Kindler J, et al. Coexistence of antitopoisomerase I and anticentromere antibodies in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(2):121-7.
213. Kuwana M, Okano Y, Pandey JP, Silver RM, Fertig N, Medsger TA, Jr. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of anti-RNA polymerase III antibody: analytical accuracy and clinical associations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2005;52(8):2425-32.
214. Satoh M, Ajmani AK, Ogasawara T, Langdon JJ, Hirakata M, Wang J, et al. Autoantibodies to RNA polymerase II are common in systemic lupus erythematosus and overlap syndrome. Specific recognition of the phosphorylated (HIO) form by a subset of human sera. *J Clin Invest*. 1994;94(5):1981-9.
215. Okano Y, Steen VD, Medsger TA, Jr. Autoantibody reactive with RNA polymerase III in systemic sclerosis. *Ann Intern Med*. 1993;119(10):1005-13.
216. Cepeda EJ, Reveille JD. Autoantibodies in systemic sclerosis and fibrosing syndromes: clinical indications and relevance. *Curr Opin Rheumatol*. 2004;16(6):723-32.

217. Kuwana M, Kimura K, Kawakami Y. Identification of an immunodominant epitope on RNA polymerase III recognized by systemic sclerosis sera: application to enzyme-linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum.* 2002;46(10):2742-7.
218. Nihtyanova SI, Parker JC, Black CM, Bunn CC, Denton CP. A longitudinal study of anti-RNA polymerase III antibody levels in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48(10):1218-21.
219. Fanning GC, Welsh KI, Bunn C, Du Bois R, Black CM. HLA associations in three mutually exclusive autoantibody subgroups in UK systemic sclerosis patients. *Br J Rheumatol.* 1998;37(2):201-7.
220. Falkner D, Wilson J, Fertig N, Clawson K, Medsger TA, Jr., Morel PA. Studies of HLA-DR and DQ alleles in systemic sclerosis patients with autoantibodies to RNA polymerases and U3-RNP (fibrillarin). *J Rheumatol.* 2000;27(5):1196-202.
221. Kuwana M, Pandey JP, Silver RM, Kawakami Y, Kaburaki J. HLA class II alleles in systemic sclerosis patients with anti-RNA polymerase I/III antibody: associations with subunit reactivities. *J Rheumatol.* 2003;30(11):2392-7.
222. Hamaguchi Y. Autoantibody profiles in systemic sclerosis: predictive value for clinical evaluation and prognosis. *J Dermatol.* 2010;37(1):42-53.
223. Van Eenennaam H, Vogelzangs JH, Lugtenberg D, Van Den Hoogen FH, Van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Identity of the RNase MRP- and RNase P-associated Th/To autoantigen. *Arthritis Rheum.* 2002;46(12):3266-72.
224. Mitri GM, Lucas M, Fertig N, Steen VD, Medsger TA, Jr. A comparison between anti-Th/To- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis patients with limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum.* 2003;48(1):203-9.
225. Falkner D, Wilson J, Medsger TA, Jr., Morel PA. HLA and clinical associations in systemic sclerosis patients with anti-Th/To antibodies. *Arthritis Rheum.* 1998;41(1):74-80.
226. Koenig M, Fritzler MJ, Targoff IN, Troyanov Y, Senecal JL. Heterogeneity of autoantibodies in 100 patients with autoimmune myositis: insights into clinical features and outcomes. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(4):R78.

227. Harvey G, Black C, Maddison P, McHugh N. Characterization of antinucleolar antibody reactivity in patients with systemic sclerosis and their relatives. *J Rheumatol.* 1997;24(3):477-84.
228. Van Eenennaam H, Vogelzangs JH, Bisschops L, Te Boome LC, Seelig HP, Renz M, et al. Autoantibodies against small nucleolar ribonucleoprotein complexes and their clinical associations. *Clin Exp Immunol.* 2002;130(3):532-40.
229. Reichlin M, Maddison PJ, Targoff I, Bunch T, Arnett F, Sharp G, et al. Antibodies to a nuclear/nucleolar antigen in patients with polymyositis overlap syndromes. *J Clin Immunol.* 1984;4(1):40-4.
230. Brouwer R, Vree Egberts WT, Hengstman GJ, Raijmakers R, van Engelen BG, Seelig HP, et al. Autoantibodies directed to novel components of the PM/Scl complex, the human exosome. *Arthritis Res.* 2002;4(2):134-8.
231. Oddis CV, Okano Y, Rudert WA, Trucco M, Duquesnoy RJ, Medsger TA, Jr. Serum autoantibody to the nucleolar antigen PM-Scl. Clinical and immunogenetic associations. *Arthritis Rheum.* 1992;35(10):1211-7.
232. Jablonska S, Blaszczyk M. Scleroderma overlap syndromes. *Adv Exp Med Biol.* 1999;455:85-92.
233. Reimer G, Steen VD, Penning CA, Medsger TA, Jr., Tan EM. Correlates between autoantibodies to nucleolar antigens and clinical features in patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 1988;31(4):525-32.
234. Aggarwal R, Lucas M, Fertig N, Oddis CV, Medsger TA, Jr. Anti-U3 RNP autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(4):1112-8.
235. Arnett FC, Reveille JD, Goldstein R, Pollard KM, Leaird K, Smith EA, et al. Autoantibodies to fibrillarin in systemic sclerosis (scleroderma). An immunogenetic, serologic, and clinical analysis. *Arthritis Rheum.* 1996;39(7):1151-60.
236. Tormey VJ, Bunn CC, Denton CP, Black CM. Anti-fibrillarin antibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2001;40(10):1157-62.

237. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M. Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1994;37(1):75-83.
238. Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, Komura K, Kaji K, et al. The clinical relevance of serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol.* 2008;158(3):487-95.
239. Jacobsen S, Halberg P, Ullman S, Van Venrooij WJ, Hoier-Madsen M, Wiik A, et al. Clinical features and serum antinuclear antibodies in 230 Danish patients with systemic sclerosis. *Br J Rheumatol.* 1998;37(1):39-45.
240. Sharp GC, Irvin WS, May CM, Holman HR, McDuffie FC, Hess EV, et al. Association of antibodies to ribonucleoprotein and Sm antigens with mixed connective-tissue disease, systematic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *N Engl J Med.* 1976;295(21):1149-54.
241. Lundberg I, Hedfors E. Clinical course of patients with anti-RNP antibodies. A prospective study of 32 patients. *J Rheumatol.* 1991;18(10):1511-9.
242. Ulanet DB, Wigley FM, Gelber AC, Rosen A. Autoantibodies against B23, a nucleolar phosphoprotein, occur in scleroderma and are associated with pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum.* 2003;49(1):85-92.
243. Savkur RS, Olson MO. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(19):4508-15.
244. Yung BY, Busch H, Chan PK. Translocation of nucleolar phosphoprotein B23 (37 kDa/pI 5.1) induced by selective inhibitors of ribosome synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1985;826(4):167-73.
245. Schmidt-Zachmann MS, Hugle-Dorr B, Franke WW. A constitutive nucleolar protein identified as a member of the nucleoplasmin family. *EMBO J.* 1987;6(7):1881-90.
246. Imai H, Ochs RL, Kiyosawa K, Furuta S, Nakamura RM, Tan EM. Nucleolar antigens and autoantibodies in hepatocellular carcinoma and other malignancies. *Am J Pathol.* 1992;140(4):859-70.

247. Brankin B, Skaar TC, Brotzman M, Trock B, Clarke R. Autoantibodies to the nuclear phosphoprotein nucleophosmin in breast cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7(12):1109-15.
248. Pfeifle J, Anderer FA, Franke M. Characterisation of nucleolar proteins as autoantigens using human autoimmune sera. *Ann Rheum Dis.* 1986;45(12):978-86.
249. Rodriguez-Sanchez JL, Gelpi C, Juarez C, Hardin JA. Anti-NOR 90. A new autoantibody in scleroderma that recognizes a 90-kDa component of the nucleolus-organizing region of chromatin. *J Immunol.* 1987;139(8):2579-84.
250. Dagher JH, Scheer U, Voit R, Grummt I, Lonzetti L, Raymond Y, et al. Autoantibodies to NOR 90/hUBF: longterm clinical and serological followup in a patient with limited systemic sclerosis suggests an antigen driven immune response. *J Rheumatol.* 2002;29(7):1543-7.
251. Fujii T, Mimori T, Akizuki M. Detection of autoantibodies to nucleolar transcription factor NOR 90/hUBF in sera of patients with rheumatic diseases, by recombinant autoantigen-based assays. *Arthritis Rheum.* 1996;39(8):1313-8.
252. Dick T, Mierau R, Sternfeld R, Weiner EM, Genth E. Clinical relevance and HLA association of autoantibodies against the nucleolus organizer region (NOR-90). *J Rheumatol.* 1995;22(1):67-72.
253. Salojin KV, Le Tonqueze M, Saraux A, Nassonov EL, Dueymes M, Piette JC, et al. Antiendothelial cell antibodies: useful markers of systemic sclerosis. *Am J Med.* 1997;102(2):178-85.
254. Hebbar M, Lassalle P, Delneste Y, Hatron PY, Devulder B, Tonnel AB, et al. Assessment of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis and Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 1997;56(4):230-4.
255. Wusirika R, Ferri C, Marin M, Knight DA, Waldman WJ, Ross P, Jr., et al. The assessment of anti-endothelial cell antibodies in scleroderma-associated pulmonary fibrosis. A study of indirect immunofluorescent and western blot analysis in 49 patients with scleroderma. *Am J Clin Pathol.* 2003;120(4):596-606.

256. Riccieri V, Germano V, Alessandri C, Vasile M, Ceccarelli F, Sciarra I, et al. More severe nailfold capillaroscopy findings and anti-endothelial cell antibodies. Are they useful tools for prognostic use in systemic sclerosis? *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26(6):992-7.
257. Negi VS, Tripathy NK, Misra R, Nityanand S. Antiendothelial cell antibodies in scleroderma correlate with severe digital ischemia and pulmonary arterial hypertension. *J Rheumatol*. 1998;25(3):462-6.
258. Ihn H, Sato S, Fujimoto M, Igarashi A, Yazawa N, Kubo M, et al. Characterization of autoantibodies to endothelial cells in systemic sclerosis (SSc): association with pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol*. 2000;119(1):203-9.
259. Fleming JN, Schwartz SM. The pathology of scleroderma vascular disease. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008;34(1):41-55; vi.
260. Tamby MC, Humbert M, Guilpain P, Servettaz A, Dupin N, Christner JJ, et al. Antibodies to fibroblasts in idiopathic and scleroderma-associated pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2006;28(4):799-807.
261. Henault J, Tremblay M, Clement I, Raymond Y, Senecal JL. Direct binding of anti-DNA topoisomerase I autoantibodies to the cell surface of fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(10):3265-74.
262. Tan FK, Arnett FC, Antohi S, Saito S, Mirarchi A, Spiera H, et al. Autoantibodies to the extracellular matrix microfibrillar protein, fibrillin-1, in patients with scleroderma and other connective tissue diseases. *J Immunol*. 1999;163(2):1066-72.
263. Murai C, Saito S, Kasturi KN, Bona CA. Spontaneous occurrence of anti-fibrillin-1 autoantibodies in tight-skin mice. *Autoimmunity*. 1998;28(3):151-5.
264. Classen JF, Henrohn D, Rorsman F, Lennartsson J, Lauwerys BR, Wikstrom G, et al. Lack of evidence of stimulatory autoantibodies to platelet-derived growth factor receptor in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2009;60(4):1137-44.
265. Loizos N, Lariccia L, Weiner J, Griffith H, Boin F, Hummers L, et al. Lack of detection of agonist activity by antibodies to platelet-derived growth factor receptor alpha in a subset of normal and systemic sclerosis patient sera. *Arthritis Rheum*. 2009;60(4):1145-51.

266. Sato S, Hayakawa I, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K. Function blocking autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol.* 2003;120(4):542-7.
267. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Mol Immunol.* 2004;41(12):1123-33.
268. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst).* 2004;3(8-9):817-26.
269. Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, Inada S, Yoshida S, Homma M. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest.* 1981;68(3):611-20.
270. Rozman B, Cucnik S, Sodin-Semrl S, Czirjak L, Varju C, Distler O, et al. Prevalence and clinical associations of anti-Ku antibodies in patients with systemic sclerosis: a European EUSTAR-initiated multi-centre case-control study. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(9):1282-6.
271. Isern RA, Yaneva M, Weiner E, Parke A, Rothfield N, Dantzker D, et al. Autoantibodies in patients with primary pulmonary hypertension: association with anti-Ku. *Am J Med.* 1992;93(3):307-12.
272. Franceschini F, Cavazzana I, Generali D, Quinzanini M, Viardi L, Ghirardello A, et al. Anti-Ku antibodies in connective tissue diseases: clinical and serological evaluation of 14 patients. *J Rheumatol.* 2002;29(7):1393-7.
273. Cooley HM, Melny BJ, Gleeson R, Greco T, Kay TW. Clinical and serological associations of anti-Ku antibody. *J Rheumatol.* 1999;26(3):563-7.
274. Yaneva M, Arnett FC. Antibodies against Ku protein in sera from patients with autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol.* 1989;76(3):366-72.
275. Hahn BH. Antibodies to DNA. *N Engl J Med.* 1998;338(19):1359-68.

276. Deocharan B, Qing X, Beger E, Putterman C. Antigenic triggers and molecular targets for anti-double-stranded DNA antibodies. *Lupus*. 2002;11(12):865-71.
277. Putterman C. New approaches to the renal pathogenicity of anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2004;3(2):7-11.
278. Clancy RM, Askanase AD, Kapur RP, Chiopelas E, Azar N, Miranda-Carus ME, et al. Transdifferentiation of cardiac fibroblasts, a fetal factor in anti-SSA/Ro-SSB/La antibody-mediated congenital heart block. *J Immunol*. 2002;169(4):2156-63.
279. Bordron A, Dueymes M, Levy Y, Jamin C, Leroy JP, Piette JC, et al. The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest*. 1998;101(10):2029-35.
280. Munoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(5):280-9.
281. Naparstek Y, Plotz PH. The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:79-104.
282. Senecal JL, Henault J, Raymond Y. The pathogenic role of autoantibodies to nuclear autoantigens in systemic sclerosis (scleroderma). *J Rheumatol*. 2005;32(9):1643-9.
283. Lunardi C, Bason C, Navone R, Millo E, Damonte G, Corrocher R, et al. Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nat Med*. 2000;6(10):1183-6.
284. Muryoi T, Kasturi KN, Kafina MJ, Cram DS, Harrison LC, Sasaki T, et al. Antitopoisomerase I monoclonal autoantibodies from scleroderma patients and tight skin mouse interact with similar epitopes. *J Exp Med*. 1992;175(4):1103-9.
285. Maul GG, Jimenez SA, Riggs E, Ziemnicka-Kotula D. Determination of an epitope of the diffuse systemic sclerosis marker antigen DNA topoisomerase I: sequence similarity with retroviral p30gag protein suggests a possible cause for autoimmunity in systemic sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(21):8492-6.

286. Sato S, Ono N, Steeber DA, Pisetsky DS, Tedder TF. CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *J Immunol.* 1996;157(10):4371-8.
287. Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G, Ehrenstein MR, Isenberg DA. An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2002;46(10):2673-7.
288. De Vita S, Zaja F, Sacco S, De Candia A, Fanin R, Ferraccioli G. Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. *Arthritis Rheum.* 2002;46(8):2029-33.
289. Edwards JC, Cambridge G. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology (Oxford).* 2001;40(2):205-11.
290. Bosello S, De Santis M, Lama G, Spano C, Angelucci C, Tulusso B, et al. B cell depletion in diffuse progressive systemic sclerosis: safety, skin score modification and IL-6 modulation in an up to thirty-six months follow-up open-label trial. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(2):R54.
291. Lafyatis R, Kissin E, York M, Farina G, Viger K, Fritzler MJ, et al. B cell depletion with rituximab in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(2):578-83.
292. Plotz PH. The autoantibody repertoire: searching for order. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):73-8.
293. Brendel V, Dohlman J, Blaisdell BE, Karlin S. Very long charge runs in systemic lupus erythematosus-associated autoantigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(4):1536-40.
294. Gill TJ, 3rd, Kunz HW, Papermaster DS. Studies on synthetic polypeptide antigens. 18. The role of composition, charge, and optical isomerism in the immunogenicity of synthetic polypeptides. *J Biol Chem.* 1967;242(14):3308-18.
295. Dohlman JG, Lupas A, Carson M. Long charge-rich alpha-helices in systemic autoantigens. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;195(2):686-96.

296. Utz PJ, Gensler TJ, Anderson P. Death, autoantigen modifications, and tolerance. *Arthritis Res.* 2000;2(2):101-14.
297. Ramirez-Sandoval R, Sanchez-Rodriguez SH, Herrera-van Oostdam D, Avalos-Diaz E, Herrera-Esparza R. Antinuclear antibodies recognize cellular autoantigens driven by apoptosis. *Joint Bone Spine.* 2003;70(3):187-94.
298. Samejima K, Svingen PA, Basi GS, Kottke T, Mesner PW, Jr., Stewart L, et al. Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274(7):4335-40.
299. Casciola-Rosen L, Andrade F, Ulanet D, Wong WB, Rosen A. Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J Exp Med.* 1999;190(6):815-26.
300. Utz PJ, Anderson P. Posttranslational protein modifications, apoptosis, and the bypass of tolerance to autoantigens. *Arthritis Rheum.* 1998;41(7):1152-60.
301. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest.* 1998;101(1):273-81.
302. Stetler DA, Jacob ST. Phosphorylation of RNA polymerase I augments its interaction with autoantibodies of systemic lupus erythematosus patients. *J Biol Chem.* 1984;259(22):13629-32.
303. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med.* 1994;179(4):1317-30.
304. Howard OM, Dong HF, Su SB, Caspi RR, Chen X, Plotz P, et al. Autoantigens signal through chemokine receptors: uveitis antigens induce CXCR3- and CXCR5-expressing lymphocytes and immature dendritic cells to migrate. *Blood.* 2005;105(11):4207-14.
305. Howard OZ. Autoantigen signalling through chemokine receptors. *Curr Opin Rheumatol.* 2006;18(6):642-6.

306. Krysko DV, D'Herde K, Vandenabeele P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis*. 2006;11(10):1709-26.
307. Michlewska S, McColl A, Rossi AG, Megson IL, Dransfield I. Clearance of dying cells and autoimmunity. *Autoimmunity*. 2007;40(4):267-73.
308. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(12):965-75.
309. Wu X, Molinaro C, Johnson N, Casiano CA. Secondary necrosis is a source of proteolytically modified forms of specific intracellular autoantigens: implications for systemic autoimmunity. *Arthritis Rheum*. 2001;44(11):2642-52.
310. Mitola S, Belleri M, Urbinati C, Coltrini D, Sparatore B, Pedrazzi M, et al. Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J Immunol*. 2006;176(1):12-5.
311. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood*. 2003;101(7):2652-60.
312. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med*. 2000;192(4):565-70.
313. Degryse B, de Virgilio M. The nuclear protein HMGB1, a new kind of chemokine? *FEBS Lett*. 2003;553(1-2):11-7.
314. Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, et al. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J Immunol*. 2004;173(1):307-13.
315. Ayer LM, Senecal JL, Martin L, Dixon GH, Fritzler MJ. Antibodies to high mobility group proteins in systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1994;21(11):2071-5.
316. Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, et al. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev*. 2003;24(6):765-81.

317. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(9):639-50.
318. Hanyaloglu AC, von Zastrow M. Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:537-68.
319. Yang X, Zhu MJ, Sreejayan N, Ren J, Du M. Angiotensin II promotes smooth muscle cell proliferation and migration through release of heparin-binding epidermal growth factor and activation of EGF-receptor pathway. *Mol Cells.* 2005;20(2):263-70.
320. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature.* 1996;379(6565):557-60.
321. Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.* 1997;16(23):7032-44.
322. Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res.* 2010;339(1):237-46.
323. Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *Faseb J.* 2006;20(1):9-22.
324. Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:729-77.
325. Kreuger J, Spillmann D, Li JP, Lindahl U. Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity. *J Cell Biol.* 2006;174(3):323-7.
326. Yanagishita M, Hascall VC. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem.* 1992;267(14):9451-4.
327. Maccarana M, Sakura Y, Tawada A, Yoshida K, Lindahl U. Domain structure of heparan sulfates from bovine organs. *J Biol Chem.* 1996;271(30):17804-10.
328. Ledin J, Staatz W, Li JP, Gotte M, Selleck S, Kjellen L, et al. Heparan sulfate structure in mice with genetically modified heparan sulfate production. *J Biol Chem.* 2004;279(41):42732-41.
329. Esko JD, Lindahl U. Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest.* 2001;108(2):169-73.

330. Parish CR. The role of heparan sulphate in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(9):633-43.
331. Gallagher JT. Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu. *J Clin Invest*. 2001;108(3):357-61.
332. Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays*. 2000;22(2):108-12.
333. Hoogewerf AJ, Kuschert GS, Proudfoot AE, Borlat F, Clark-Lewis I, Power CA, et al. Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry*. 1997;36(44):13570-8.
334. Lever R, Page CP. Novel drug development opportunities for heparin. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(2):140-8.
335. Hirsh J, Raschke R. Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004;126(3 Suppl):188S-203S.
336. Diamant Z, Timmers MC, van der Veen H, Page CP, van der Meer FJ, Sterk PJ. Effect of inhaled heparin on allergen-induced early and late asthmatic responses in patients with atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153(6 Pt 1):1790-5.
337. Salas A, Sans M, Soriano A, Reverter JC, Anderson DC, Pique JM, et al. Heparin attenuates TNF-alpha induced inflammatory response through a CD11b dependent mechanism. *Gut*. 2000;47(1):88-96.
338. Denton CP, Howell K, Stratton RJ, Black CM. Long-term low molecular weight heparin therapy for severe Raynaud's phenomenon: a pilot study. *Clin Exp Rheumatol*. 2000;18(4):499-502.
339. Frizelle S, Schwarz J, Huber SA, Leslie K. Evaluation of the effects of low molecular weight heparin on inflammation and collagen deposition in chronic coxsackievirus B3-induced myocarditis in A/J mice. *Am J Pathol*. 1992;141(1):203-9.
340. Lee JH, Lee H, Joung YK, Jung KH, Choi JH, Lee DH, et al. The use of low molecular weight heparin-pluronic nanogels to impede liver fibrosis by inhibition the TGF-beta/Smad signaling pathway. *Biomaterials*. 2011;32(5):1438-45.

341. Shi J, Hao JH, Ren WH, Zhu JR. Effects of heparin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol*. 2003;9(7):1611-4.
342. Nihtyanova SI, Denton CP. Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(2):112-6.
343. Forster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):362-71.
344. Sanchez-Sanchez N, Rirol-Blanco L, Rodriguez-Fernandez JL. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol*. 2006;176(9):5153-9.
345. Banas B, Wornle M, Berger T, Nelson PJ, Cohen CD, Kretzler M, et al. Roles of SLC/CCL21 and CCR7 in human kidney for mesangial proliferation, migration, apoptosis, and tissue homeostasis. *J Immunol*. 2002;168(9):4301-7.
346. Sakai N, Wada T, Yokoyama H, Lipp M, Ueha S, Matsushima K, et al. Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(38):14098-103.
347. Bruhl H, Mack M, Niedermeier M, Lochbaum D, Scholmerich J, Straub RH. Functional expression of the chemokine receptor CCR7 on fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(12):1771-4.
348. Pierce EM, Carpenter K, Jakubzick C, Kunkel SL, Evanoff H, Flaherty KR, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts migrate and proliferate to CC chemokine ligand 21. *Eur Respir J*. 2007;29(6):1082-93.
349. Kohout TA, Nicholas SL, Perry SJ, Reinhart G, Junger S, Struthers RS. Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *J Biol Chem*. 2004;279(22):23214-22.
350. Otero C, Groettrup M, Legler DF. Opposite fate of endocytosed CCR7 and its ligands: recycling versus degradation. *J Immunol*. 2006;177(4):2314-23.

351. Bonacchi A, Petrai I, Defranco RM, Lazzeri E, Annunziato F, Efsen E, et al. The chemokine CCL21 modulates lymphocyte recruitment and fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2003;125(4):1060-76.
352. Pierce EM, Carpenter K, Jakubzick C, Kunkel SL, Flaherty KR, Martinez FJ, et al. Therapeutic targeting of CC ligand 21 or CC chemokine receptor 7 abrogates pulmonary fibrosis induced by the adoptive transfer of human pulmonary fibroblasts to immunodeficient mice. *Am J Pathol*. 2007;170(4):1152-64.
353. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-46.
354. Li W, Fan J, Chen M, Guan S, Sawcer D, Bokoch GM, et al. Mechanism of human dermal fibroblast migration driven by type I collagen and platelet-derived growth factor-BB. *Mol Biol Cell*. 2004;15(1):294-309.
355. Huang C, Jacobson K, Schaller MD. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 20):4619-28.
356. Pullikuth AK, Catling AD. Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: a perspective. *Cell Signal*. 2007;19(8):1621-32.
357. Diaz B, Barnard D, Filson A, MacDonald S, King A, Marshall M. Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling. *Mol Cell Biol*. 1997;17(8):4509-16.
358. Tvorogov D, Wang XJ, Zent R, Carpenter G. Integrin-dependent PLC-gamma1 phosphorylation mediates fibronectin-dependent adhesion. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 3):601-10.
359. Buckley CT, Sekiya F, Kim YJ, Rhee SG, Caldwell KK. Identification of phospholipase C-gamma1 as a mitogen-activated protein kinase substrate. *J Biol Chem*. 2004;279(40):41807-14.
360. Redondo-Munoz J, Jose Terol M, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A. Matrix metalloproteinase-9 is up-regulated by CCL21/CCR7 interaction via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling and is involved in CCL21-driven B-cell chronic lymphocytic leukemia cell invasion and migration. *Blood*. 2008;111(1):383-6.

361. Huang CY, Lee CY, Chen MY, Yang WH, Chen YH, Chang CH, et al. Stromal cell-derived factor-1/CXCR4 enhanced motility of human osteosarcoma cells involves MEK1/2, ERK and NF-kappaB-dependent pathways. *J Cell Physiol.* 2009;221(1):204-12.
362. Fields TA, Casey PJ. Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J.* 1997;321 (Pt 3):561-71.
363. Bardi G, Lipp M, Baggiolini M, Loetscher P. The T cell chemokine receptor CCR7 is internalized on stimulation with ELC, but not with SLC. *Eur J Immunol.* 2001;31(11):3291-7.
364. Otero C, Eisele PS, Schaeuble K, Groettrup M, Legler DF. Distinct motifs in the chemokine receptor CCR7 regulate signal transduction, receptor trafficking and chemotaxis. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 16):2759-67.
365. Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Shibuta K, et al. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res.* 2002;62(10):2937-41.
366. Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(1):258-63.
367. Shannon LA, Calloway PA, Welch TP, Vines CM. CCR7/CCL21 migration on fibronectin is mediated by phospholipase Cgamma1 and ERK1/2 in primary T lymphocytes. *J Biol Chem.* 2010;285(50):38781-7.
368. Cano PO, Jerry LM, Sladowski JP, Osterland CK. Circulating immune complexes in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 1977;29(2):197-204.
369. Fischbach M, Char D, Christensen M, Daniels T, Whaley K, Alspaugh M, et al. Immune complexes in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1980;23(7):791-5.
370. Zhao X, Okeke NL, Sharpe O, Batliwalla FM, Lee AT, Ho PP, et al. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(4):R94.

371. Naparstek Y, Ben-Yehuda A, Madaio MP, Bar-Tana R, Schuger L, Pizov G, et al. Binding of anti-DNA antibodies and inhibition of glomerulonephritis in MRL-lpr/lpr mice by heparin. *Arthritis Rheum.* 1990;33(10):1554-9.
372. van Bruggen MC, Walgreen B, Rijke TP, Corsius MJ, Assmann KJ, Smeenk RJ, et al. Heparin and heparinoids prevent the binding of immune complexes containing nucleosomal antigens to the GBM and delay nephritis in MRL/lpr mice. *Kidney Int.* 1996;50(5):1555-64.
373. Hedberg A, Fisman S, Fenton KA, Fenton C, Osterud B, Mortensen ES, et al. Heparin exerts a dual effect on lupus nephritis by enhancing enzymatic chromatin degradation and preventing chromatin-binding in glomerular membranes. *Arthritis Rheum.* 2010.
374. Fineschi S, Goffin L, Rezzonico R, Cozzi F, Dayer JM, Meroni PL, et al. Antifibroblast antibodies in systemic sclerosis induce fibroblasts to produce profibrotic chemokines, with partial exploitation of toll-like receptor 4. *Arthritis Rheum.* 2008;58(12):3913-23.
375. Ronda N, Gatti R, Giacosa R, Raschi E, Testoni C, Meroni PL, et al. Antifibroblast antibodies from systemic sclerosis patients are internalized by fibroblasts via a caveolin-linked pathway. *Arthritis Rheum.* 2002;46(6):1595-601.
376. Jacob L, Viard JP, Allenet B, Anin MF, Slama FB, Vandekerckhove J, et al. A monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody binds to a 94-kDa cell-surface protein on various cell types via nucleosomes or a DNA-histone complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(12):4669-73.
377. Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 1991;64(4):841-8.
378. Parish CR. Heparan sulfate and inflammation. *Nat Immunol.* 2005;6(9):861-2.
379. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 1980;23(5):581-90.

380. Zeileis A. Object-oriented computation of sandwich estimators. *Journal of Statistical Software* 2006;16(9):1-16.
381. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing. Vienna, Austria; 2010.
382. Kovalszky I, Dudas J, Olah-Nagy J, Pogany G, Tovary J, Timar J, et al. Inhibition of DNA topoisomerase I activity by heparan sulfate and modulation by basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Biochem.* 1998;183(1-2):11-23.
383. Ishii K, Katase A, Andoh T, Seno N. Inhibition of topoisomerase I by heparin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982;104(2):541-7.
384. Fannon M, Nugent MA. Basic fibroblast growth factor binds its receptors, is internalized, and stimulates DNA synthesis in Balb/c3T3 cells in the absence of heparan sulfate. *J Biol Chem.* 1996;271(30):17949-56.
385. Weiner ES, Hildebrandt S, Senecal JL, Daniels L, Noell S, Joyal F, et al. Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud's disease. A prospective study. *Arthritis Rheum.* 1991;34(1):68-77.
386. Rek A, Brandner B, Geretti E, Kungl AJ. A biophysical insight into the RANTES-glycosaminoglycan interaction. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1794(4):577-82.
387. Proudfoot AE. The biological relevance of chemokine-proteoglycan interactions. *Biochem Soc Trans.* 2006;34(Pt 3):422-6.
388. de Paz JL, Moseman EA, Noti C, Polito L, von Andrian UH, Seeberger PH. Profiling heparin-chemokine interactions using synthetic tools. *ACS Chem Biol.* 2007;2(11):735-44.
389. Nguyen VA, Sgonc R, Dietrich H, Wick G. Endothelial injury in internal organs of University of California at Davis line 200 (UCD 200) chickens, an animal model for systemic sclerosis (Scleroderma). *J Autoimmun.* 2000;14(2):143-9.
390. Matziolis G, Perka C, Disch A, Zippel H. Effects of fondaparinux compared with dalteparin, enoxaparin and unfractionated heparin on human osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* 2003;73(4):370-9.

391. Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K. Skin tissue engineering - In vivo and in vitro applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(4-5):352-66.
392. L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *Faseb J.* 1998;12(1):47-56.
393. Takamori M, Maruta T. Immunoabsorption in myasthenia gravis based on specific ligands mimicking the immunogenic sites of the acetylcholine receptor. *Ther Apher.* 2001;5(5):340-50.
394. Wallukat G, Muller J, Hetzer R. Specific removal of beta1-adrenergic autoantibodies from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2002;347(22):1806.
395. Hedberg A, Fisman S, Fenton KA, Fenton C, Osterud B, Mortensen ES, et al. Heparin exerts a dual effect on murine lupus nephritis by enhancing enzymatic chromatin degradation and preventing chromatin binding in glomerular membranes. *Arthritis Rheum.* 2011;63(4):1065-75.

Annexe I : Résultats supplémentaires

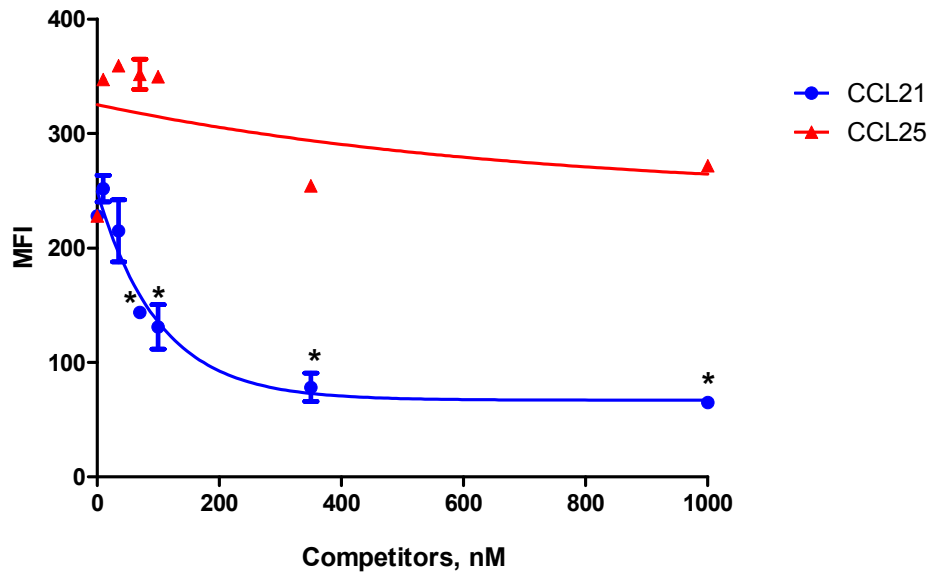


Figure A1 : Cytométrie en flux de l'interaction de la topo avec la surface cellulaire en présence de CCL21 et CCL25. La topo-PE (1.0 ug/ml) et différentes concentrations de CCL ont été ajoutés simultanément aux cellules. La liaison de la topo-PE sur les cellules vivantes fut évaluée par cytométrie en flux. Les résultats démontrent que la liaison de la topo diminue au fur et à mesure que la concentration de CCL21 augmente. Le CCL25 n'empêche pas la liaison de la topo à la surface des fibroblastes. * = $P < 0.05$.

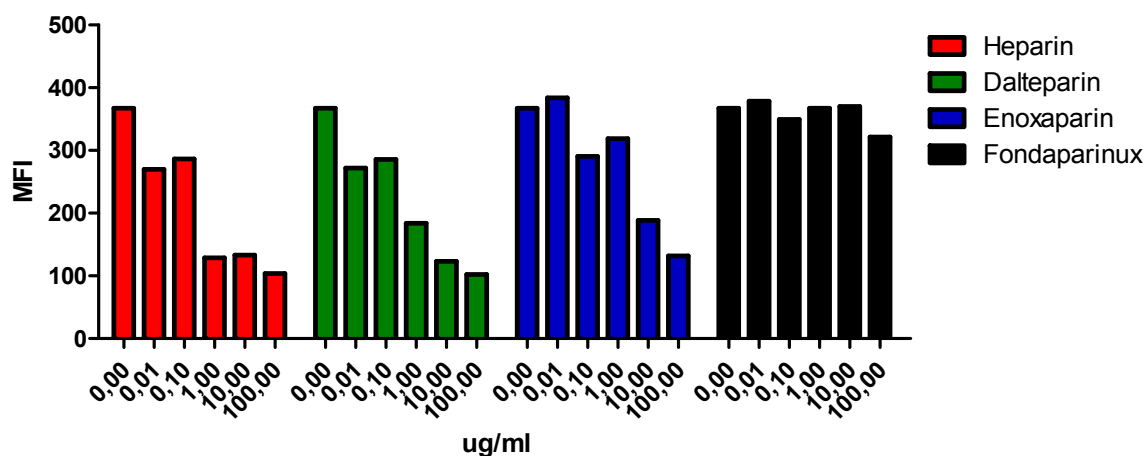


Figure A2 : Cytométrie en flux de la liaison de la topo à la surface du fibroblaste en présence d'héparine. Les héparines furent ajoutées à la topo-PE 30 minutes avant l'ajout sur les fibroblastes et la liaison de la topo-PE sur les cellules vivantes fut évaluée par cytométrie en flux. Les résultats sont représentatifs de 3 différentes expériences.